

**Quantitatives Monitoring der Thrombozytenadhäsivität
mit dem Platelet Adhesion Assay (PADA)
bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Peter Möller**
geboren am 28. Februar 1966 in Erfurt

Erster Gutachter : Prof. Dr. O.W. Witte
Zweiter Gutachter : Prof. Dr. Th Mayer
Dritter Gutachter : PD Dr. R. Malessa

Tag der öffentlichen Verteidigung : 06.04.2010

Abkürzungsverzeichnis

AIS	Akute zerebrale Ischämie / akuter ischämischer Schlaganfall
AGG	sAggrenox [®] Mischpräparat aus ASS und Di pyridamol
AI	Adhäsionsindex
ALM	Univariates allgemeines lineares Modell
ASS	Acetylsalizylsäure
CLO	Clopidogrel
COX-1	Cyclooxygenase 1
CRP	C- reaktives Protein
ESPro	Erlanger Schlaganfall Projekt
ESRS	Essener Stroke Rezidiv Score
GPCR	G-protein-coupled Receptors
GP VI	Kollagenrezeptor
ICB	Spontane intrazerebrale Blutung
KHK	Koronare Herzkrankheit
LTA	Lichttransmissions Aggregometrie
NNT	Number needed to treat
PADA	Platelet Adhesion Assay
PAR	Protease activated Receptors
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PDGF	Platelet derived growth factor
PFO	Persistierendes Foramen ovale
PHEN	Phenprocoumon
POC	Point of care
PRP	Platelet rich plasma
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
rRR	Relative Risikoreduktion
SVT	Sinusvenenthrombose
TCD	Transkranielle Dopplersonografie
TEE	Transösophageale Echokardiografie
TIA	Transiente ischämische Attacke
TRAP	Thrombin-Rezeptor-Activation Peptide
UFH	PTT gesteuerte Therapie mit unfractioniertem Heparin i.v.
VASP	Vasodilator stimuliertes Phosphoprotein
vWF	Von Willebrand Faktor

Ein ausführliches Verzeichnis der erwähnten Rezeptoren- und Antigenbezeichnungen sowie deren Funktion findet sich im Anhang unter 9.1 .

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Zusammenfassung	7
2. Einleitung	
2.1. Problemstellung	9
2.2. Theoretische Grundlagen der Thrombozytenaktivierung	11
2.3. Thrombozytenaktivierung und PADA-Test	17
2.4. Andere Messverfahren der Thrombozytenaktivierung	19
3. Ziele der Arbeit	21
4. Patienten, Material und Methoden	22
4.1. Patienten	
4.1.1. Untersuchungskollektive	22
4.1.2. Einschlusskriterien	22
4.1.3. Ausschlusskriterien	22
4.2. Protokoll	
4.2.1. Untersuchungsprotokoll	23
4.2.2. Schlaganfalleinteilung nach TOAST, zerebralem Korrelat in der Bildgebung und Klinik	24
4.2.3. PADA-Blutentnahmen	24
4.3. Methoden	
4.3.1. PADA Testbeschreibung und -durchführung	24
4.3.2. Konstanzprüfung	26
4.4. Datenerfassung und Statistik	
4.4.1. Datenerfassung	27
4.4.2. Statistik	27
5. Ergebnisse	
5.1. Beschreibung des Patienten- und Kontrollkollektives	
5.1.1. Beschreibung der Patienten- und Kontrollgruppen	28
5.1.2. Alter, Geschlecht und Risikofaktoren	29
5.1.3. Ätiologie, Klinik und morphologisches Korrelat der akuten zerebralen Ischämie und TIA	31
5.1.4. Komplikationen im Beobachtungszeitraum	32
5.1.5. Zeitpunkt der Bestimmung des PADA -AI	34
5.1.6. PADA Verlaufskontrolle unter Sekundärprophylaxe	34

	Seite
5.1.7. Test auf Normalverteilung der PADA-AI in den Patientengruppen	35
5.2. PADA-AI in den Patientengruppen und im Normkollektiv	36
5.2.1. PADA-AI bei Komplikationen	37
5.3. Einflüsse auf den PADA-AI durch Laborwerte und Risikofaktoren	39
5.4. PADA-AI in Abhängigkeit von der Patientengruppe	43
5.5. PADA-AI in Abhängigkeit von der Subgruppe der akuten zerebralen Ischämie und TIA	
5.5.1. PADA-AI und Ätiologie nach TOAST-Kriterien	45
5.5.2. PADA-AI und zerebrales Korrelat in der Bildgebung	47
5.5.3. PADA-AI und Schwere der Klinik nach Barthel-Index und NIH-Score	49
5.6. Einflüsse der Sekundärprophylaxe auf den PADA-AI	
5.6.1. ASS	50
5.6.2. sAggrenox%	50
5.6.3. Clopidogrel	51
5.6.4. Phenprocoumon	55
5.6.5. PTT gesteuerte i.v. Therapie mit unfractioniertem Heparin	56
5.7. Doppelbestimmung des PADA-AI zur Konstanzprüfung	
5.7.1. Korrelation bei Doppelbestimmung	57
5.7.2. Bestimmung der Abhängigkeit des Messergebnisses von der Reihenfolge der Blutentnahme	58
6. Diskussion	
6.1. Einflüsse auf den PADA-AI	59
6.2. PADA-AI bei akuter zerebraler Ischämie	63
6.3. PADA-AI und transiente ischämische Attacke	67
6.4. PADA-AI in ätiologischen und bildmorphologischen Subgruppen nach akuter zerebraler Ischämie	69
6.5. Einflüsse einer neu begonnenen Sekundärprophylaxe mit ASS , pAggrenoxí , unfractioniertem Heparin und Phenprocoumon auf den PADA-AI	71
6.6. Einflüsse einer neu begonnenen Sekundärprophylaxe mit Clopidogrel auf den PADA-AI	74

	Seite
6.7. Drug monitoring und Clopidogrel-Resistenz	78
6.8. Einschränkungen der Studie	83
7. Schlussfolgerungen	85
8. Literatur Æ und Quellenverzeichnis	87
9. Anhang	
9.1. Verzeichnis der verwendeten Rezeptoren- und Antigen- bezeichnungen sowie deren Funktion	96
9.2. Essener Stroke Rezidiv Score	96
9.3. Lebenslauf	97
9.4. Danksagung	98
9.5. Ehrenwörtliche Erklärung	99

1. Zusammenfassung

Aktuell steht kein verlässlicher und breit anwendbarer Laborparameter zur Verfügung, der eine Vorhersage des klinischen Ansprechens auf eine Sekundärprophylaxe nach stattgehabter akuter zerebraler Ischämie mit einem Thrombozytenaggregationshemmer erlaubt oder mit dem sich die individuelle Gefahr von Blutungskomplikationen abschätzen lassen könnte. In der vorliegenden offenen, prospektiven kontrollierten Studie soll der Frage nachgegangen werden, ob der PADA-Test in der Diagnostik der akuten zerebralen Ischämie und in der Therapieplanung der Sekundärprophylaxe mit Thrombozytenaggregationshemmern bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie und TIA sinnvoll eingesetzt werden kann. Der PADA-Test untersucht den Funktionszustand der Thrombozyten bezüglich ihrer Fähigkeit zur Bindung an Fibrinogen über den GP IIb/IIIa-Rezeptor unter den Bedingungen von niedrigem Scherstress. Insgesamt wurden 528 Patienten untersucht, von denen 401 der endgültigen Analyse zur Verfügung standen. Von diesen hatten 229 Patienten eine akute zerebrale Ischämie, 28 eine TIA und 7 Patienten eine ICB erlitten. Weitere 40 Patienten wurden wegen anderer neurologischer Erkrankungen behandelt und hatten länger als 6 Monate zurückliegend eine akute zerebrale Ischämie erlitten. Weiterhin wurden 5 Patienten mit einer gesicherten systemischen Vaskulitis und 3 Patienten mit einer SVT untersucht. Als Kontrollgruppe dienten 89 Patienten, die wegen anderer neurologischer Nichtgefäßerkrankungen stationär behandelt wurden. Bei 100 Probanden erfolgte zusätzlich eine Konstanzprüfung mittels Doppelbestimmung des PADA-AI.

In der vorliegenden Studie konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass sowohl ältere Patienten, als auch Patienten mit niedrigerer Thrombozytenzahl und Patienten mit einem erhöhten Rezidivrisiko, wie es im ~~s~~Essener Stroke Rezidiv Score erfasst wird, einen signifikant höheren PADA-AI aufweisen, und zwar unabhängig von der zur stationären Aufnahme führenden Erkrankung. Weiterhin wiesen Patienten mit einer extra- oder intrakraniellen Stenose der hirnversorgenden Gefäße, Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung und Patienten mit arteriellem Hypertonus im Vergleich zu Patienten ohne diese Merkmale im Mittel signifikant höhere PADA-AI auf.

Patienten mit einer akuten zerebralen Ischämie wiesen einen signifikant höheren PADA-AI im Vergleich zu den Patienten nach einer TIA und der Kontrollgruppe auf, auch unter Berücksichtigung der Einflüsse von Alter und Thrombozytenzahl. Weiterhin fand sich ein signifikant höherer PADA-AI bei den Patienten mit akuter zerebraler Ischämie mit einer nachweisbaren kortikalen oder subkortikalen Läsion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Patienten mit einem erhöhten PADA-AI möglicherweise ein höheres Risiko tragen, eine komplette Ischämie zu erleiden oder / und eine komplette Ischämie zu einer sekundären Aktivierung der Thrombozyten-adhäsivität führen kann.

Patienten mit einer akuten zerebralen Ischämie aus den ätiologischen Subgruppen TOAST 1 (> 50 % Stenose der hirnersorgenden Arterie) und TOAST 5 (konkurrierende Ursachen / ungeklärte Ätiologie) zeigten unter Berücksichtigung der Einflüsse von Alter und Thrombozytenzahl einen deutlichen Trend zu einem höheren PADA-AI im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies kann Ausdruck einer mit dem PADA-Test erfassbaren Thrombozytenaktivierung bei vorliegender Arteriosklerose sein.

Die vorliegende Untersuchung zeigte, dass eine neu begonnene Sekundär - prophylaxe mit Clopidogrel zu einer signifikanten Abnahme des PADA-AI führt und sich dieser entsprechend zur Untersuchung der Wirkung von Clopidogrel (drug monitoring) anbieten könnte. Dabei waren interindividuell deutliche Unterschiede in der Ausprägung der Änderung des PADA-AI auffällig. Erstmals konnte nachgewiesen werden, dass die Potenz von Clopidogrel zur Reduktion des PADA-AI bei jüngeren Patienten, Patienten mit geringerem Rezidivrisiko (Essener Stroke Rezidiv Score) und initial höherem PADA-AI größer ist. Die klinische Bedeutung dieser Ergebnisse sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

Die in früheren (kardiologischen) PADA-Studien nicht berücksichtigten Einflüsse von Alter und Thrombozytenzahl auf den PADA-AI müssen in zukünftigen Studien beachtet werden.

Auf Grund der im Einzelfall unerwartet hohen Abweichungen des PADA-AI im Rahmen der Konstanzprüfung mittels Doppelbestimmung sollten in zukünftigen Studien weitere Daten zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und deren Bedeutung erhoben werden.

2. Einleitung

2.1. Problemstellung

Der akute ischämische Schlaganfall ist die häufigste Erkrankung, die zu einer bleibenden Behinderung führt. Nach aktuellen Daten ereignen sich in Deutschland 185 000 bis 220 000 Schlaganfälle pro Jahr (Weimar C. und Diener HC. 2003). Bezogen auf Deutschland zeigte das Erlanger-Stroke-Projekt (ESPro) in einer prospektiven Untersuchung für die akute zerebrale Ischämie eine Inzidenz von 1,37/1000 Erkrankungen /Jahr (Kolomski-Rabas P. et al. 1998).

Thrombozyten sind über unterschiedliche Mechanismen an der Genese der akuten zerebralen Ischämie beteiligt und spielen als Vermittler pharmakologischer Effekte in der Sekundärprophylaxe mit Thrombozytenaggregationshemmern eine herausragende Rolle.

Nachdem ein Patient eine akute zerebrale Ischämie, eine TIA oder eine zerebrale Rezidivischämie erlitten hat, muss, in Abhängigkeit von der anzunehmenden Ursache, den Risikofaktoren, den Befunden der Umfelddiagnostik und den Begleiterkrankungen, über die Sekundärprophylaxe entschieden werden.

Dabei stützt man sich aktuell auf die klinischen Untersuchungsbefunde und Scores wie den Essener Stroke Rezidiv Score (ESRS) zur Abschätzung des Rezidivrisikos unter Berücksichtigung multipler potentieller Einflussfaktoren (Diener HC. et al. 2005). Aus den Ergebnissen der sPROFESS-Studie wird ersichtlich, dass eine Unterteilung in ätiologische Subgruppen nach TOAST-Kriterien keine Vorhersage in Bezug auf das Ansprechen auf eine Sekundärprophylaxe mit sAggrenox oder Clopidogrel zulässt (Sacco RL. et al. 2008).

Sofern keine Indikation für eine orale Antikoagulation besteht, wird bei fehlenden Kontraindikationen dem Patienten ein Thrombozytenaggregationshemmer verordnet. Dafür stehen aktuell im Wesentlichen drei Möglichkeiten zur Verfügung : Acetylsalicylsäure, sAggrenox und Clopidogrel.

Alle drei Pharmaka haben in Bezug auf die Sekundärprävention einen signifikanten Vorteil gegenüber Placebo, sind jedoch im Vergleich mit Placebo auch mit einem erhöhten Blutungsrisiko verbunden (Victor L. et al. 2002).

Alle Thrombozytenaggregationshemmer erreichen in den klinischen Studien nur eine mäßige relative Risikoreduktion (rRR), im Einzelnen: ASS rRR 18 -22 %, NNT 40/2 Jahre; sAggrenox® rRR 37 %, NNT 33/2 Jahre; Clopidogrel im Vergleich zu ASS rRR 8%, NNT im Vergleich zu ASS 125/2 Jahre (Diener HC., Weber R. 2007). Es fanden sich in allen Studien zur Sekundärprophylaxe im Vergleich zu Placebo erhöhte Raten von Blutungskomplikationen, die Ausdruck des antikoagulatorischen Effektes der Thrombozytenaggregationshemmer sind.

So wird unter einer Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmer das Gesamtrisiko für leichte Blutungskomplikationen mit 5,1%, für schwere mit 3,7 %, und für lebensbedrohliche mit 2,2 % angegeben (Victor L. et al. 2002). Dabei findet sich das größte Risiko für i.v. GPIIb/IIIa-Antagonisten, gefolgt von oralen GPIIb/IIIa-Antagonisten und der Kombination von Clopidogrel mit ASS. Aktuell steht kein verlässlicher und breit anwendbarer Laborparameter zur Verfügung, der eine Vorhersage des Ansprechens auf eine der Therapien mit einem Thrombozytenaggregationshemmer erlaubt oder mit dem sich die individuelle Gefahr von Blutungskomplikationen unter einer Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern abschätzen lassen könnte (Goto S. et al. 2004).

Die bisher zur Verfügung stehenden Labor methoden zur Bestimmung der Wirkung von ASS und Clopidogrel wurden in den Sekundärprophylaxestudien noch nicht an einer ausreichend großen Population untersucht, so dass über ihren klinischen Nutzen keine Aussage getroffen werden kann (Serebruany VL. et al. 2007).

2.2. Theoretische Grundlagen der Thrombozytenaktivierung

Thrombozyten sind neben den plasmatischen Gerinnungsfaktoren nicht nur für die physiologische Blutgerinnung verantwortlich, sondern spielen auch eine entscheidende Rolle bei der pathologischen Thrombusentstehung, insbesondere im fließenden Blut (Goto S. 2004).

Der genaue Mechanismus der Thrombozytenaktivierung ist noch nicht geklärt. In einer ganzen Reihe von Publikationen wurden Teilschritte der Thrombozytenaktivierung untersucht. Es hat sich gezeigt, dass viele verschiedene Faktoren, je nach zugrunde liegender Ausgangssituation, in unterschiedlichem Ausmaß an der Thrombozytenaktivierung beteiligt sind. Das in der vorliegenden Studie benutzte Platelet Adhesion Assay (PADA-Test) arbeitet auf der Grundlage einer Thrombozytenadhesion an Fibrinogen, die über den GPIIb/IIIa Rezeptor vermittelt wird, das an eine Kunststoffoberfläche gebunden wird. Die für das Verständnis der vorliegenden Arbeit wesentlichen Mechanismen, insbesondere der GPIIb/IIIa-Rezeptoraktivierung, Thrombozytenadhesion und -aggregation sollen im Folgenden kurz zusammengefasst werden.

Die Aktivierung von Thrombozyten ist der erste Schritt in der Bildung von Thromben und vermittelt die nachfolgenden Schritte, wie Adhäsion, shape change (Oberflächenumformung), Freisetzung von Aktivierungsmarkern (wie CD62p und andere) und schließlich die Thrombusbildung.

Thrombozyten können im Blut in unterschiedlichen Aktivitätsstadien zirkulieren. So konnte gezeigt werden, dass es unterschiedliche Gruppen von Thrombozyten mit unterschiedlicher Reaktivität auf ADP gibt, die sich durch ihre Dichte und den Gehalt von alpha-Granula unterscheiden (Milovanovic M. et al. 2003). Diese Verteilung der Thrombozyten ist abhängig vom Alter der Thrombozyten und den auf sie einwirkenden Stimuli. So fanden sich Zusammenhänge zwischen Thrombozytenaktivierung und dem Einwirken von Stresshormonen (Nicole YL. et al. 2002), dem Schlafapnoe-Syndrom (Reinhardt WH. et al. 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine am ehesten genetisch bedingte Heterogenität in Bezug auf die Aktivierbarkeit und das Ansprechen auf Agonisten existiert (Alan D. et al. 2000).

Die Aktivierung von Thrombozyten vollzieht sich in mehreren Stadien, wobei die ersten Stadien prinzipiell reversibel sind.

Nach Bildung der Thrombozyten aus den Megakaryozyten zirkulieren diese in einem Ruhestadium im Blut. In diesem nichtaktivierten Stadium ist der nichtaktivierte GPIIb/IIIa-Rezeptor nur in der Lage, sich an Fibrinogen zu binden (Savage B. et al. 1992). Kommt es zu einem ausreichenden Reiz, gehen sie in ein aktiviertes Stadium über.

Die nachfolgenden Schritte bis zur Thrombusbildung werden unterteilt in Thrombozytenadhäsion, -aggregation und im letzten Schritt Thrombusbildung. Weiterhin können zirkulierende Thrombozyten durch Agonisten, wie Thrombin und ADP, aus dem ruhenden, inaktiven Stadium auch ohne direkten Kontakt mit einer verletzten oder pathologisch veränderten Gefäßstruktur aktiviert werden. Die Thrombozytenadhäsion wird als erster Schritt angesehen, mit dem sich einzelne Thrombozyten über spezifische Membranrezeptoren an eine Gefäßwandpathologie, wie etwa bei Verletzung, anlagern. Sie wird über verschiedene Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten ermöglicht. So konnte eine Adhäsion über immobilisiertes Fibrinogen (durch andere Thrombozyten oder Plasma), freigelegtes Kollagen und auch den von Willebrand Faktor (vWF) nachgewiesen werden.

Die Adhäsion ist abhängig von der Ausprägung des einwirkenden Scheerstress. So können inaktivierte Thrombozyten bei hohem Scheerstress (wie er zum Beispiel in Arteriolen oder an pathologisch veränderten Gefäßwänden vorliegt) nicht über den GPIIb/IIIa Rezeptor an Fibrinogen binden, sondern nur über den GPIb-IX-Rezeptorkomplex an immobilisierten vWF am freigelegten Kollagen. Bei niedrigem Scheerstress kann eine Adhäsion an Fibrinogen auch direkt über den GPIIb/IIIa-Rezeptor erfolgen (Polanowski-Grabowska R. et al. 1999, Savage B. et al. 1996, Savage B. et al. 1998).

Während der Aktivierung der Thrombozyten kommt es zu einer Konformationsänderung der Oberflächenproteine, insbesondere des GPIIb/IIIa-Rezeptors, der dann auch an andere Oberflächenproteine, wie z.B. den vWF binden kann (Savage B. et al. 1992) und eine erhöhte Bindungsrate an Fibrinogen aufweist (Arya M. et al. 2003). Die Konformationsänderungen werden durch Änderungen im Zytoskelett mit vermehrter Aktin-Polymerisation und Verbindung von Aktin-Bindungsproteinen mit dem GPIIb/IIIa Rezeptor vermittelt, wodurch dieser in seiner Fähigkeit zur Bindung an Fibrinogen reguliert wird (Santos et al. 2000).

Der GPIIb/IIIa-Rezeptor ändert dabei seine Konformation durch einen inside-out-Mechanismus (Shattil SJ. et al. 1998).

Diese Adhäsion unterliegt einer zusätzlichen Regulation, an denen die Oberflächenproteine und auch weiteren Faktoren, wie die Kalzium- und Magnesiumkonzentration, beteiligt sind (Whiss P. et al. 2002, Bombeli T. et al. 1998). Die Adhäsion initiiert über den GPIIb/IIIa-Rezeptor die darauf folgenden Schritte der Thrombozytenaktivierung wie shape change (Formänderung), Freisetzung von ADP und Serotonin aus der dense granula und Plättchenfaktor 4, Fibrinogen, p-Selektin und vWF aus der Alpha-Granula mit nachfolgender weiterer Konformationsänderung (spreading) einzelner Thrombozyten. Diese Mechanismen werden durch eine kalziumabhängige Konformationsänderung des Zytoskelett vermittelt (Ulhas P. et al. 2003). Erst im weiteren Verlauf kommt es zur Aggregation (Zusammenlagerung mehrerer Thrombozyten über eine Vernetzung mit Hilfe von Fibrinogen über den GPIIb/IIIa-Rezeptor) und schließlich Thrombusbildung.

Besondere Verhältnisse finden sich an arteriosklerotisch veränderten Gefäßen, da es hier neben der Aktivierung über den Scheerstress zusätzlich zu einer Aktivierung durch die pathologisch veränderte Gefäßwand und die schon daran angehefteten Thrombozyten kommt (McBane RD. et al. 2003).

Arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen oder turbulente Flüsse führen zu einem pathologischen Prozess, in dessen Folge es durch die Thrombozytenadhäsion zur lokalen Thrombusbildung, Plaquewachstum und Vermittlung von entzündlichen Vorgängen kommt (Ruggeri ZM. et al. 2007).

Bindet sich Fibrinogen an den GPIIb/IIIa-Rezeptor, kommt es im nächsten Schritt zu einem outside-in signaling, dass, wie oben beschrieben, zur Aktivierung der Thrombozytenaggregation führt.

Der GPIIb/IIIa-Rezeptor unterliegt insgesamt einer komplexen Regulation, die noch nicht vollständig aufgeklärt ist. So ergeben sich zusätzlich zu den Einflüssen von Fibrinogen und den vWF starke Einflüsse auf den GPIIb/IIIa-Rezeptor durch ADP und Thrombin (Nylander S. et al. 2004). Es wird vermutet, dass die löslichen Agonisten wie ADP und Thrombin in vivo zur Stabilisierung der Thromben beitragen, nachdem eine Aktivierung durch Kollagen und vWF stattgefunden hat (Goto S. 2002).

Thrombin ist nicht nur ein Enzym zur Katalyse zur Umwandlung von löslichem Fibrinogen in unlösliches Fibrin sondern auch ein starker Thrombozyten-aktivator. Die Aktivierung der Plättchen erfolgt dabei durch eine einmalige und spezifische Proteolyse einer Klasse von α G-protein-coupled receptors (GPCRs) bestimmter α protease-activated receptors (PARs). Infolge der Proteolyse der PARs durch Thrombin erfolgt die Freilegung eines gebundenen Liganden, genannt α Thrombin-Rezeptor-Activation Peptide (TRAP) (Vu TK. et al. 1991) . Von den bekannten PARs können 3 (PAR1, PAR2 und PAR4) durch Thrombin aktiviert werden (Xu WF. et al. 1998), wobei nur PAR1 und PAR4 auf menschlichen Plättchen nachgewiesen sind (Ayalá YM. et al. 2001). Davon hat PAR1 eine höhere Affinität zu Thrombin und unterliegt möglicherweise einer biphasischen Aktivierung (Covic L. et al. 2000). Dadurch wird PAR1 bei niedrigen Thrombinkonzentrationen und bei steigender Thrombinkonzentration PAR4 aktiviert.

ADP ist ein schwächerer Thrombozytenagonist als Thrombin und ist in der dichten Granula der Plättchen gelagert. Es wird durch einen primären Agonisten, wie zum Beispiel Thrombin, freigesetzt. ADP wiederum aktiviert 2 GPCRs auf der Plättchenoberfläche: P2Y₁ und P2Y₁₂ (Hollteter G. et al. 2001 und Zhang FL. et al. 2001). P2Y₁ überträgt das Signal genauso wie PAR1 und PAR4 über G- α -q, während bei P2Y₁₂ die Übertragung über G- α -i erfolgt. Thrombin führt somit nicht nur zur Freisetzung von ADP, sondern auch, genauso wie ADP über P2Y₁ über G- α -q, zur Formänderung (shape change) der Plättchen. P2Y₁ aktiviert die Phospholipase C und führt darüber zur Freisetzung von intrazellulärem Calcium und dadurch zur Formänderung als Reaktion auf die ADP-Stimulation. P2Y₁₂ hemmt die Adenyl-Cyclase und vermindert dadurch die Konzentration von cAMP, das die Plättchenaktivierung hemmt. Zusätzlich kommt es über das P2Y₁₂-abhängige G- α -i zur Freisetzungsreaktion (Dangelmaier C. et al. 2001) und direkten Aktivierung von GPIIb/IIIa Rezeptoren über die Phosphoinositide-3-kinase (Kauffstein G. et al. 2001). So führt ein angeborener Defekt des P2Y₁₂-Rezeptor zu einer erhöhten Blutungsneigung (nicht aber ein Defekt von P2Y₁) (Cattaneo M. et al. 2003).

Die Aktivierung des P2Y₁₂-Rezeptor durch ADP führt somit zur Freisetzung von zusätzlichen GPIIb/IIIa-Rezeptoren und deren Aktivierung. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass eine Blockierung von P2Y₁₂ die Aktivierung der Plättchen durch Thrombin teilweise und durch ADP vollständig hemmen kann (Nylander S. et al. 2004).

Neben der dosisabhängigen Wirkung der Agonisten auf die Membranrezeptoren können durch diese auch eine zusätzliche Regulation der Affinität des GPIIb/IIIa-Rezeptors und eine Beeinflussung der Freisetzungsreaktion erfolgen. Die daran beteiligten Mechanismen sind sehr komplex, so dass die Betrachtung eines Teilschrittes nie den gesamten Regulationsvorgang erklären kann (Bennetti J. et al. 1999).

Nach Bindung von Fibrinogen an den GPIIb/IIIa-Rezeptor können sich Thrombozytenaggregate durch Überbrückung mit Fibrinogen ausbilden, da Fibrinogen zwei Bindungsseiten aufweist. Dieser Vorgang kann durch GPIIb/IIIa Antagonisten vollständig unterbunden werden (Moser M. 2003).

Durch eine Konformationsänderung des Fibrinogens in Fibrin unter dem Einfluss von Thrombin und Plasminogen kommt es zur irreversiblen Bildung von Thromben.

Die Thrombozytenaggregation unterscheidet sich grundsätzlich von Thrombusbildung und ist mit dieser nicht gleichzusetzen, da an der Thrombusbildung neben den Thrombozyten weitere plasmatische Gerinnungsfaktoren und Blutzellen beteiligt sind. Je nach Zusammensetzung der Thromben unterscheidet man *white clots*, die nur aus vernetzten Thrombozyten bestehen, von *red clots*, in denen auch Erythrozyten enthalten sind. Bei den *red clots* geben die Erythrozyten im Verlauf der Thrombusbildung ADP ab, das über den ADP-Rezeptor der Thrombozyten zusätzlich zur Aktivierung der Thrombozyten beiträgt.

Zusätzlich zur Thrombenbildung können durch aktivierte Thrombozyten auch Mikropartikel (kleine Membranbestandteile) freigesetzt werden. Diese Mikropartikel besitzen prokoagulatorische Eigenschaften, die 50 - 100 fach stärker sind, als die von aktivierten Thrombozyten selbst (Sinauridze E.I. et al. 2007). So führen sie zu einer Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade, die am Ende wiederum Thrombin als stärksten Agonisten freisetzt.

Weiterhin wurden Einflüsse der aktivierten Thrombozyten auf die Plaqueentstehung und eine Beeinflussung des Gefäßendothels beschrieben (Kaul S. et al. 1994). So führt das aus der Alpha-Granula aktivierter Thrombozyten freigesetzte p-Selektin (CD62p) zu einer Vermittlung der Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten, zur Stabilisierung der Thrombozytenaggregation und Bildung von prokoagulatorischen Mikropartikeln und Cytokinen (Merten M. et al. 2004), die einen lokal entzündlichen Prozess bedingen. In einem Mausmodell konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass eine Infusion von aktivierten Thrombozyten und p-Selektin auch an gesundem Endothel zu einer Freisetzungsreaktion von Selektin (CD62e) und vWF aus den Weibel-Palade Körperchen im Endothel führen kann, die dann eine Kaskade mit lokaler Entzündung und nachfolgender Plaquebildung auslösen können (Dole VS. et al. 2005).

Bei der Thrombusbildung und den nachfolgenden lokalen Prozessen spielen neben der Aktivierung von GPIIb/IIIa auch andere Thrombozytenoberflächenproteine eine entscheidende Rolle. So konnte unter Bedingungen von high-shear-stress eine Beteiligung von GPIb α , GPVI, Epinephrin - Rezeptoren, ADP-Rezeptoren und deren Stimulation durch unterschiedliche Substanzen wie Kollagen, vWF, Fibrinogen, Katecholamine und Thrombin nachgewiesen werden (Goto S., 2004). Dabei wird den Rezeptoren für Kollagen (GPVI) und den vWF (GPIb α) die größte Bedeutung zugeschrieben, da sie zur Immobilisation der Thrombozyten an der Gefäßwand führen. So konnte in einem Mausmodell mit einem experimentell verursachten Hirninfarkt nachgewiesen werden, dass die Blockade des GPIb Rezeptors und GPVI Rezeptors zu einem besseren Outcome und weniger Blutungskomplikationen führt als die Blockade des GPIIb/IIIa - Rezeptors (Kleinschnitz C. et al. 2007). Als Ursache wird bei einer alleinigen GPIIb/IIIa - Rezeptorblockade die fehlende Verhinderung von ischämisch verursachten Entzündungsreaktionen angesehen, da die Adhäsion von Thrombozyten an die Gefäßwand über den vWF und Kollagen nicht gehemmt wird.

Außerdem unterdrücken die GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten nur die Thrombozytenaggregation, nicht aber die Thrombozytenaktivierung über andere Mechanismen (wie z.B. vWF) mit der damit verbundenen Freisetzung von Alpha-Granula und Präsentation von Oberflächenproteinen, die sowohl die

plasmatische Gerinnung beeinflussen, als auch zur Vermittlung von Interaktionen mit Leukozyten beitragen (Goto S. 2002).

Unter Berücksichtigung der komplexen Vorgänge kann eine alleinige Betrachtung der GPIIb/IIIa-Rezeptorfunktion nicht ausreichen, um alle Effekte einer Sekundärprophylaxe zu interpretieren. Sie bietet jedoch die Möglichkeit einer Aussage über den aktuellen Aktivierungszustand von Thrombozyten und den davon abhängigen oben genannten Mechanismen sowie der Erfassung von Medikamentenwirkungen (drug monitoring).

2.3. Thrombozytenaktivierung und PADA Test

Da der PADA-Test zu 90% auf einer Bindung von Thrombozyten an Fibrinogen über den GPIIb/IIIa-Rezeptoren beruht (Nowak G. et al. 2005) und dieser Rezeptor bei niedrigem Scherstress nur an Fibrinogen bindet (siehe oben), kann mit Hilfe dieses Verfahrens eine Aussage über die Affinität zur Bindung an Fibrinogen und die Zahl der GPIIb/IIIa-Rezeptoren getroffen werden. Die Bindung an Fibrinogen kann sowohl über den inaktiven als auch aktiven GPIIb/IIIa-Rezeptor erfolgen (siehe oben). Da es nach einer Thrombozytenaktivierung zu einer Zunahme der GPIIb/IIIa-Aktivität und damit vermehrten Bindung an Fibrinogen kommt, kann über die Änderung des PADA-AI eine Aussage über den veränderten Aktivitätszustand des GPIIb/IIIa-Rezeptors erfolgen. Somit bietet der PADA-Test die Möglichkeit, zu untersuchen, in welchem Ausmaß im peripheren Blut der untersuchten Person, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (Kollektiv von untersuchten Probanden ohne Erkrankungen, die zu einer Thrombozytenaktivierung führen), aktivierte Thrombozyten zirkulieren. In diesem Fall ist, als Ausdruck einer vermehrten Adhäsion von Thrombozyten an Fibrinogen, der PADA-AI erhöht. Der PADA-Test arbeitet mit einem geringen Scherstress und ist deshalb mit anderen Scherstress induzierenden Standardmessmethoden nicht zu vergleichen (wie etwa PFA-100). Weiterhin bietet er den Vorteil, dass keine Agonisten verwendet werden müssen und es somit nicht zu einer zusätzlichen agonisteninduzierten Thrombozytenaktivierung kommt (Nowak G. et al. 2005). Über die genauen Vorgänge an den Thrombozyten während des PADA Testes gibt es in der Literatur keine genauen Aussagen, insbesondere nicht, inwieweit es durch die Schüttelinkubationsphase zu einer Aktivierung von Thrombozyten

kommt oder nicht. Der genaue Mechanismus der Thrombozytenaktivierung durch leichten Scheer-Stress ist noch nicht bekannt und nur wenig untersucht. DeBruyn et al. kamen in einer experimentellen Arbeit zu der Auffassung, dass es Rezeptoren gibt, die speziell auf leichten Scheer-Stress reagieren können und zu einer Aktivierung von Thrombozyten führen. So wird die small GTPase RAP1 durch milden Scheerstress aktiviert und führt zu einer Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors (de Bruyn KM. et al. 2003).

Nach persönlicher Mitteilung (Prof. Nowak G., Institut für Klinische Hämostaseologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena) wurde nach Sicherung des Grundprinzips des PADA-Tests (Bindung von Fibrinogen an die Polymeroberfläche und Anheftung von Thrombozyten über den GPIIb/IIIa Rezeptor an das immobilisierte Fibrinogen) die optimale Schüttelinkubationszeit und Schüttelfrequenz experimentell so ermittelt, dass die Mehrzahl der Proben von gesunden Probanden einen AI von 50 aufwiesen.

Während der Schüttelinkubation und Anlagerung der Thrombozyten an das oberflächengebundene Fibrinogen kommt es bis zu einem PADA-AI von 80 lediglich zu einer Thrombozytenadhäsion, wie dies in mikroskopischen Studien nachgewiesen werden konnte (persönliche Mitteilung Prof. Nowak, Institut für Klinische Hämostaseologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena). Somit kann in dem Bereich bis zu einem PADA-AI von 80 eine zusätzliche, aggregationsvermittelte Stimulation noch ruhender Thrombozyten weitgehend ausgeschlossen werden.

Bei der weiteren Beurteilung der Ergebnisse der vorliegenden Studie im Vergleich zu anderen Messverfahren der Thrombozytenaktivierung ist daher zu beachten, dass es sich beim PADA-Test um die Bestimmung der Thrombozytenadhäsion handelt, während insbesondere aggregometrische Verfahren oder Verfahren mit Einsatz von Agonisten immer zu einer weiteren Thrombozytenaktivierung einschließlich Aggregation und Freisetzungsreaktion führen, so dass die Ergebnisse auch aus diesem Grund nicht direkt miteinander zu vergleichen sind.

Ergebnisse von vergleichenden Untersuchungen mit anderen Aktivierungsmarkern und dem PADA-Test wurden bisher nicht veröffentlicht.

2.4. Andere Messverfahren der Thrombozytenaktivierung

Es steht im Moment noch kein Messverfahren zur Verfügung, das die komplexen Vorgänge der Thrombozytenaktivierung vollständig erfassen kann. Dies gilt erst recht unter kombinierter Thrombozytenaggregationshemmertherapie (Goto S. 2002). Die zur Verfügung stehenden Verfahren müssen unterschieden werden in aggregometrische Verfahren und Verfahren zur Erfassung von Oberflächenproteinen, die entsprechend markiert wurden (Durchflusszytometrie oder ELISA) sowie deren Kombinationen mit definiertem Scheerstress wie beim PFA-100. Weiterhin muss zwischen Untersuchungen im Vollblut und im Platelet rich plasma (PRP) unterschieden werden.

Die Untersuchungsverfahren unterscheiden sich weiterhin durch die verwendeten Agonisten und deren Dosierung. So werden in der Aggregometrie beispielsweise ADP-Dosen zwischen 2 und 30 μmol ADP eingesetzt. Eine weitere Schwierigkeit bei der Interpretation der Befunde ist die mangelnde Vergleichbarkeit der methodisch unterschiedlichen Studien und Verfahren.

In einer Studie von Hezard et al. konnte keine Übereinstimmung zwischen der Flow-cytometrischen Messung von vasodilatatorstimuliertem Phosphoprotein (VASP), einem häufig genutzten Aktivitätsmarker für den P2Y₁₂ Rezeptor, und anderen Methoden (Aggregometrie und Western blot) festgestellt werden.

Es fand sich hier keinerlei Übereinstimmung zwischen den Methoden bei der Identifikation von Patienten, die eine Clopidogrelmedikation hatten und Probanden ohne Medikation (Hezard N. et al. 2005). Geiger et al. fanden dagegen eine Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen der Messung vom VASP und der ADP-induzierten Aggregometrie (Geiger J. et al 2005). Auch in Bezug auf die Bestimmung der ASS-Resistenz zeigte sich in einer Studie von Harrison et al. zwischen den Ergebnissen des PFA-100, der Ultegra-RPFA und einer konventionellen Lichttransmission-Aggregometrie (LTA) keine Übereinstimmung.

In dieser Studie fand sich auch keine Übereinstimmung zwischen den beiden methodisch (point of care POC) ähnlichen Verfahren PFA-100 und Ultegra-RPFA ($p=0,15$) (Harrison P. et al. 2005). Auch bei einem Vergleich von LTA mit PFA-100 und einer anderen POC Methode (VerifyNow) fanden sich zwar eine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen ($p<0,001$), jedoch deutliche Unterschiede der Sensitivität und Spezifität zwischen den Methoden, so dass in dieser Untersuchung darauf hingewiesen wurde, dass die

als pathologisch interpretierten Werte der einzelnen Verfahren einer weiteren klinischen Evaluation bedürfen (Paniccia R. et al. 2007).

Ein von der Grundidee her vergleichbares Verfahren mit dem PADA-Test ist der Homburger Retentions-Test. Auch hier wird die Aktivierung der Thrombozyten über das Anheften aktivierter Thrombozyten an Oberflächen und die sich daraus ergebende Differenz der Thrombozytenzahl . Retentionsindex RI - bestimmt. In der ursprünglichen Version arbeitete der Test ohne Agonisten, im Verlauf der Untersuchungen wurde jedoch eine Aktivierung über eine geringe Menge ADP eingeführt (Krischek B. et al. 2005).

Allen aufgeführten Verfahren zur Bestimmung der Thrombozytenfunktion gemeinsam ist der Nachteil einer für die Thrombozyten unphysiologischen ex vivo Diagnostik und die fehlende Untersuchung ihrer Bedeutung im Rahmen einer großen Sekundärprophylaxestudie, so dass die klinische Bedeutung der Ergebnisse bisher nicht evaluiert ist.

3. Ziele der Arbeit

Das Monitoring der über den GPIIb/IIIa-Rezeptor vermittelten Thrombozyten-adhäsivität eröffnet theoretisch die Möglichkeit, eine erkrankungsrelevante Thrombozytenaktivierung nachzuweisen. Zusätzlich könnte sich die Möglichkeit eröffnen, eine diesen Rezeptor modulierende Medikation hinsichtlich des Ansprechens und der Wirkung im Verlauf (drug monitoring) zu kontrollieren. Dies könnte zu einer verbesserten Patientenselektion vor Einleitung einer Sekundärprophylaxe führen, ein fehlendes oder unzureichendes Ansprechen auf die Therapie frühzeitig aufdecken und potentiell auch zur Vermeidung von Blutungskomplikationen beitragen.

Mit dem sPlated Adhaesion Assay (PADA) steht ein quantitatives Assay zur Bestimmung der Thrombozytenadhäsion zur Verfügung (Schumann A. et al. 2004). Mit ihm ist die diagnostische Messung des Funktionszustandes der Thrombozyten bezüglich ihrer Fähigkeit zur Bindung an Fibrinogen über den GPIIb/IIIa-Rezeptor unter den Bedingungen von niedrigem Scheerstress möglich (Schumann A. et al. 2005).

Die vorliegende Studie nutzt den PADA-Test erstmalig, um in einer größeren Population von Schlaganfallpatienten die Thrombozytenadhäsivität als Ausdruck einer stattgehabten GPIIb/IIIa-Rezeptoraktivierung zu untersuchen und mit den Ergebnissen in einer Gruppe von Patienten mit neurologischen Erkrankungen ohne aktuell e kardiovaskuläre Krankheiten mit allenfalls gering ausgeprägten kardiovaskulären Risikofaktoren zu vergleichen. Außerdem sollen erste Daten zur Auswirkung einer transienten ischämischen Attacke auf den PADA-AI erhoben werden. Weiterhin interessieren mögliche Einflüsse auf den PADA-AI bedingt durch Patientenmerkmale, Laborparameter, vorbestehende kardiovaskuläre Risikofaktoren und vorausgegangene ischämische Ereignisse. Bei einem Teilkollektiv der Patienten, die eine neue Sekundärprophylaxe erhielten und die Möglichkeit einer Verlaufskontrolle des PADA-AI bestand, sollten die Einflüsse durch die Sekundärprophylaxe auf den PADA-AI untersucht werden und die Möglichkeit des drug monitoring geprüft werden. Entsprechend soll zu der Frage Stellung genommen werden, ob der PADA-Test zukünftig potentiell Eingang in die Diagnostik der akuten zerebralen Ischämie und in der Therapieplanung der Sekundärprophylaxe mit Thrombozytenaggregationshemmern finden könnte.

4. Patienten, Material und Methoden

4.1. Patienten

4.1.1. Untersuchungskollektive

Alle Patienten waren stationär behandelte Patienten der Klinik für Neurologie und Klinische Neurophysiologie des Sophien- und Hufeland Klinikum Weimar gGmbH.

Die Datenaufnahme erfolgte im Zeitraum vom 01.02.2005 bis 31.03.2007.

Alle Patienten erklärten ihr Einverständnis auf dem von den Ethikkommissionen der Landesärztekammer Thüringen (Votum vom 11.11.2004) und der Friedrich-Schiller Universität Jena (Votum vom 10.01.2005) genehmigten Aufklärungsbogen.

4.1.2. Einschlusskriterien

Patienten ab dem 18. Lebensjahr, eine obere Altersbegrenzung gab es nicht. Patienten mit akuter zerebraler Ischämie, transienter Ischämischer Attacke, intrazerebraler Blutung, Sinusvenenthrombose, systemischer Vaskulitis, Patienten mit mehr als 6 Monate zurückliegender akuter zerebraler Ischämie, die wegen anderer neurologischer Erkrankungen im Untersuchungszeitraum stationär behandelt wurden und Patienten mit neurologischen Erkrankungen nicht vaskulärer Genese.

4.1.3. Ausschlusskriterien

Patienten mit bekannter oder im Verlauf der Behandlung nachgewiesener Thrombozytopathie (z.B. von Willebrand Jürgens Syndrom und andere) und Patienten mit Erkrankungen, die bekanntermaßen mit einer Störung an den GPIIb/IIIa-Rezeptoren einhergehen.

4.2. Protokoll

4.2.1. Untersuchungsprotokoll

Die PADA-Studie wurde als offene, kontrollierte, prospektive Studie durchgeführt.

Die Patienten wurden entsprechend den anamnestischen und klinischen Daten in folgende Untersuchungsgruppen eingeteilt:

1. Patienten mit einer sicheren akuten zerebralen Ischämie
2. Patienten mit einer sicheren transienten ischämischen Attacke (TIA)
3. Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen ohne klinisch oder anamnestische Hinweise auf einen stattgehabten Hirninfarkt oder TIA und ohne akute zerebrale Ischämie (Kontrollgruppe)
4. Patienten mit einer anderen zur stationären Einweisung führenden neurologischen Erkrankung und anamnestisch gesicherter stattgehabter akuter zerebraler Ischämie, die mehr als 6 Monate zurückliegt
5. Patienten mit einer akuten intrazerebralen Blutung (ICB)
6. Patienten mit einer akuten Sinusvenenthrombose (SVT)
7. Patienten mit einer systemischen Vaskulitis

Für alle Patienten wurden die Basisdaten erfasst. Diese umfassen Geschlecht, Alter, anamnestische Angaben zu Hypertonie, Diabetes mellitus, KHK, vorangegangenen akuten Myokardinfarkt (AMI), kardiale Stent-Implantation oder Bypass-OP, Migräne, stattgehabte akute zerebrale Ischämie oder TIA, Nikotinabusus und die zur stationären Einweisung führende Erkrankung. Während des Aufenthaltes wurden für alle Patienten folgende Parameter bestimmt: PADA-AI, Thrombozytenzahl, Quick, PTT, BSG, CRP, Fibrinogen. Zusätzlich wurde für alle Patienten ohne akute zerebrale Ischämie (Kontrollgruppe), mit frischer akuter zerebraler Ischämie, einer TIA oder zurückliegender akuter zerebraler Ischämie anhand des Risikoprofils der ~~s~~Essener Stroke Rezidiv Score% (siehe Anhang 9.2.) bestimmt. Dieser Score wurde anhand der Daten der CAPRIE Studie berechnet und an Daten der Essener Schlaganfalldatenbank auf Reproduzierbarkeit geprüft wurde (Diener HC. et al. 2005).

4.2.2. Schlaganfalleinteilung nach TOAST - Kriterien, zerebralem Korrelat in der Bildgebung und Klinik

Für alle Patienten mit akuter zerebraler Ischämie oder TIA erfolgte eine ätiologische Zuordnung nach der vermuteten Ursache entsprechend den TOAST-Kriterien (Harold P. et al. 1993).

Es wurden für alle Patienten mit akuter zerebraler Ischämie erfasst:

- das morphologische Korrelat der Ischämie in der zerebralen Bildgebung entsprechend der Kriterien von Ringelstein und Weiller (Ringelstein E.B. und Weiller C. 1990),
- das Ausmaß der durch den akute zerebrale Ischämie verursachten Behinderung mit Hilfe des Barthel-Index und NIH-Score,
- die Befunde der extra- und transkraniellen Doppler- und Duplexsonografie einschließlich Bestimmung der Intima-Media Dicke (IMT . gemessen an der linken ACC kurz vor der Bifurkation)

Im Rahmen der ätiologischen Zuordnung wurden die Befunde vom Langzeit-EKG (Absolute Arrhythmie) und der Echokardiografie (PFO, intrakardiale Thromben, Sludge im linken Vorhof) erhoben.

Zusätzlich wurden folgende Laborparameter bestimmt: Gesamtcholesterin, LDL, HbA1c, Protein-C global, ATIII.

4.2.3. PADA-Blutentnahmen

Die Bestimmung des ersten PADA-AI erfolgte unter standardisierten Bedingungen nach dem erklärten Einverständnis der Patienten zum nächst möglichen Untersuchungszeitpunkt an Werktagen.

4.3. Methoden

4.3.1. PADA-Test Beschreibung und Durchführung

Der PADA-Test ist ein von der Firma HAEMOSYS GmbH entwickeltes Testverfahren zur quantitativen Messung der Plättchenadhäsivität im Blut ex vivo. Dabei werden einer antikoagulierten Vollblut-Messprobe (Citrat-Blut) eine definierte Zahl von speziell designten Polymerpartikeln zugesetzt, an denen sich blutprobeneigenes Protein, speziell Fibrinogen, anlagert.

Während der kurzen Schüttel-Inkubationsphase werden die Blutplättchen der Probe einem definierten Scherstress ausgesetzt, der eine, ihrem aktuellen Reaktivitätszustand entsprechende, Adhäsion an die Polymerpartikel auslöst. Eine Kontrollprobe ohne Partikelzusatz wird mitgeführt. Am Ende der Testprozedur wird in der Mess- und Kontrollprobe die Zahl freier Thrombozyten bestimmt. Diese Zahl bildet die Grundlage für die Berechnung des Adhäsionsindex (AI) (PADA, Produktbeschreibung Stand 2003).

Die Blutentnahme erfolgte durch den Studienarzt nach Aufklärung und Einverständnis des Patienten standardisiert mit einer Multifly-Kanüle mit Multiadapter (Ausführung 21Gx3/4%^aNr. 2 mit einer Schlauchlänge von 60 mm) der Firma Sarstedt. Es wurde auf eine exakte Punktion geachtet und das Blut nur aus einer leicht gestauten Vene entnommen. Standardisiert wurden die Blutproben mit einer Sarstedt-Citrat-Monovette gewonnen, die unter leichtem Zug, ohne Schaumbildung, bis zur Markierung vollständig gefüllt wurde.

Unmittelbar nach der Abnahme wurde das Blut in der Monovette mit dem Citratzusatz durch 5-maliges vorsichtiges Schwenken vermischt.

Die Blutproben wurden auf dem Anforderungsformular mit der exakten Blutentnahmezeit versehen und sofort mit einem Kurier ohne weiteres Schütteln in das Labor gebracht.

Um bei laufendem Routinebetrieb eine Weiterverarbeitung im Labor innerhalb der vorgegebenen Zeiten zu ermöglichen, erfolgte die Probeentnahme nur zu definierten Zeiten. Die Bestimmung des PADA-AI laut Untersuchungsprotokoll der Firma HAEMOSYS GmbH erfolgte im Labor des Sophien- und Hufeland-Klinikum Weimar gGmbH. Die AI-Bestimmung erfolgte definiert innerhalb von 40 - 60 Minuten nach der Blutabnahme.

Vor der AI-Bestimmung wurden Blutproben mit Anzeichen einer erfolgten Gerinnungsaktivierung verworfen. Die makroskopisch einwandfreien Proben wurden vor dem Pipettieren durch vorsichtiges Schwenken homogenisiert.

Anschließend wurden aus der Probe je 200 µl in ein Proberöhrchen (rot markiert) sowie in ein Kontrollröhrchen (farblos) pipettiert.

Dem Proberöhrchen wurden 10 µl Partikelsuspension zugesetzt.

Der Kontrollprobe wurden 10 µl Kontrolllösung zugesetzt.

Beide Proben wurden anschließend exakt für 5 Minuten (unter Verwendung einer Stoppuhr) auf dem Minischüttler inkubiert und im Anschluss im Blutzellautomaten die Thrombozytenzahl bestimmt und der AI entsprechend folgender Formel berechnet::

Berechnung des AI:

$$AI = \frac{\boxed{\text{Plättchenzahl* Kontrolle}} - \boxed{\text{Plättchenzahl* Messprobe}}}{\boxed{\text{Plättchenzahl* Kontrolle}}} \times 100$$

* (Mittelwert bei Doppelbestimmung)

Die Messung selbst dauert bei gleichzeitiger Verarbeitung von 3 Proben etwa 15 Minuten.

4.3.2. Konstanzprüfung

Die Konstanzprüfung erfolgte bei 100 zusätzlichen Patienten über eine Doppelbestimmung des AI aus zwei Citratmonovetten die während derselben Venenpunktion gefüllt wurden. Die Weiterverarbeitung erfolgte nach dem unter 4.3.1. beschriebenen Protokoll.

4.4. Datenerfassung und Statistik

4.4.1. Datenerfassung

Die Datenerfassung erfolgte prospektiv im Rahmen der stationären Behandlung der Patienten. Alle in die Untersuchung eingegangenen Daten wurden in der archivierten Patientenakte hinterlegt.

Alle Daten wurden direkt in eine SPSS-Tabelle eingegeben. Nach Abschluss der Dateneingabe für jeden Patienten erfolgte eine Kontrolle auf Vollständigkeit und Korrektheit durch den Vergleich mit den Eintragungen in der Patientenakte.

4.4.2. Statistik

Die statistischen Berechnungen und die Erstellung der Grafiken erfolgten mit Hilfe der Software SPSS, Version 14.0. Für die Nutzung dieser Software wurde für diese Arbeit vom Rechenzentrum der FSU Jena eine Lizenz erteilt. Entsprechend der Fragestellung wurden folgende statistische Berechnungen durchgeführt:

1. Einflüsse auf den PADA-AI durch Laborwerte (Korrelation nach Pearson) und kardiovaskuläre Risikofaktoren (ANOVA)
2. Analyse auf Unterschiede im PADA-AI zwischen den Patientengruppen (ANOVA mit post hoc Analyse nach Bonferroni, zusätzlich zur grafischen Darstellung der signifikant voneinander verschiedenen Gruppen durch Analyse nach Duncan)
3. Einflüsse auf den PADA-AI durch die Sekundärprophylaxe (gepaarter T-Test)
4. Konstanzprüfung mittels Bestimmung der Korrelation (nach Pearson)
5. Untersuchung auf Beeinflussung des PADA-AI durch die Erkrankung und Ätiologie unter Berücksichtigung der Kofaktoren Alter und Thrombozytenzahl durch ein univariates allgemeines lineares Modell (ALM)

Für alle statistischen Berechnungen wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt bei einem Konfidenzintervall (KI) von 95 %.

5. Ergebnisse

5.1. Beschreibung des Patienten- und Kontrollkollektives

5.1.1. Beschreibung der Patienten- und Kontrollgruppen

Insgesamt wurden 528 Patienten in die Studie eingeschlossen.

339 Patienten wurden wegen eines akuten Schlaganfalls eingewiesen.

Davon hatten 296 Patienten eine frische akute zerebrale Ischämie (AIS), 33 eine TIA und 10 Patienten eine ICB erlitten. 100 Patienten wurden wegen anderer neurologischer Erkrankungen stationär behandelt (Kontrollgruppe, Erkrankungen siehe Tabelle 1), 68 Patienten wurden wegen anderer neurologischer Erkrankungen behandelt und hatten vor länger als 6 Monate zurückliegend einen akuten zerebralen Ischämie erlitten. Weiterhin wurden 8 Patienten mit einer gesicherten systemischen Vaskulitis und 3 Patienten mit einer SVT untersucht. Zusätzlich erfolgte bei 100 Patienten die Konstanzprüfung mittels Doppelbestimmung des PADA-AI.

Tabelle 1:
Diagnosen der Kontrollgruppe

Erkrankung	Anzahl der Patienten gesamt n=100
Migräne	21
epileptischer Anfall	15
Abklärung Demenz	12
Multiple Sklerose / akute demyelinisierende Encephalomyelitis	10
Polyneuropathie	10
Lumboischialgie	5
Kopfschmerzen	4
Hirntumor	4
Panikstörung / Somatisierungsstörung	4
idiopathische Facialisparesie	3
chronische Schmerzen	3
paroxysmaler Lagerungsschwindel	3
Synkope	3
Morbus Parkinson	3

Bei 23 Patienten (4,1 %), die in die Studie eingeschlossen wurden, war durch Probleme in der laborchemischen Analyse (z.B. Nachweis von Mikrogerinnseln in der Probe) keine Bestimmung des PADA-AI möglich.

Retrospektiv wurden aus der statistischen Analyse alle Patienten (n = 104) ausgeschlossen, die bereits vor Bestimmung des ersten PADA-AI mindestens eine Dosis Clopidogrel erhalten hatten. Anlass dazu war der in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesene Einfluss von Clopidogrel auf den PADA-AI (vergleiche Tabelle 28, Seite 51).

Nach Ausschluss dieser Patienten ergab sich die in Tabelle 2 aufgeführte Patientenzahl sowie Alters- und Geschlechtsverteilung für die weitere Analyse.

5.1.2. Alter, Geschlecht und Risikofaktoren

Bei der Untersuchung der Altersverteilung in den Patientengruppen war der Altersdurchschnitt der Patienten mit einer akuten intrazerebralen Blutung signifikant höher, der Patienten mit einer Sinusvenenthrombose signifikant niedriger als der der anderen Patientengruppen bei allerdings sehr geringer Patientenzahl.

Tabelle 2
Alter, Geschlecht und HESSener Stroke Risk Score¹ (ESRS) in den Patientengruppen

Patienten- gruppe	Anzahl n= 401	Alter Mittelwert (Min/Max)	% männlich	% weiblich	Mittelwert ESRS (Standard- abweichung)
Kontrollgruppe	89	61,9 (30/89)	47	53	1,7 (1,6)
akute zerebrale Ischämie	229	70,5 (27/93)	49	51	3,31 (1,5)
TIA	28	67,1 (31/97)	57	43	2,45 (1,3)
zurückliegender Hirnfarkt	40	70,0 (27/87)	48,5	51,5	3,89 (1,4)
intrazerebrale Blutung	7	74,2 (58/88)	50	50	4,10 (1,3)
Vaskulitis	5	59,8 (19/76)	50	50	2,14 (0,5)
Sinusvenen- thrombose	3	44,5 (37/53)	0	100	0,33 (0,5)

Die Patientengruppen „Sinusvenenthrombose“, „Vaskulitis“ und „intra- zerebrale Blutung“ wurden in der weiteren statistischen Analyse (zu geringe Patientenzahlen) nicht berücksichtigt.

Patienten der Kontrollgruppe waren mit durchschnittlich 62 Jahren signifikant jünger als Patienten mit akuter (70 Jahre) und zurückliegender zerebraler Ischämie (70 Jahre).

Weiterhin wurden die Unterschiede bezüglich des Vorkommens kardiovaskulärer Risikofaktoren zwischen den Patientengruppen analysiert (vergleiche Tabelle 3).

Tabelle 3:
Relative Häufigkeiten in Prozent spezifischer Risikofaktoren in den Patientengruppen

Risikofaktor	Kontroll- gruppe	akute zerebrale Ischämie	TIA	zurückliegender Hirnfarkt
Absolute Arrhythmie	4 %	20,5 %	9,1 %	24,6 %
Z.n. Myokardinfarkt	3 %	6,4 %	3,0 %	4 %
bekannte koronare Herzerkrankung	18 %	38,8 %	18,2 %	36,8 %
pAVK	2,0 %	8,4 %	3,0 %	7,1 %
Hypertonie	43 %	78,5 %	63,6 %	67,6 %
Diabetes mellitus	22,0 %	38,9 %	18,2 %	39,7 %
aktueller Nikotinabusus	10 %	21,8 %	21 %	12,8 %
Essener-Risiko-Score	1,73	3,23	2,39	3,79

Die statistische Analyse erfolgte auf der Grundlage des Essener Stroke Rezidiv Score (ESRS). In der statistischen Analyse (ANOVA) fand sich zwischen den Patientengruppen ein signifikanter Unterschied ($p = 0,000$). In der post-hoc-Analyse nach Bonferroni konnte nachgewiesen werden, dass die Patienten der Kontrollgruppe im Vergleich zu Patienten mit akuter zerebraler Ischämie ($p = 0,000$) und zurückliegendem Hirnfarkt ($p = 0,000$) einen signifikant niedrigeren Wert auf dem Essener Rezidiv Stroke Risiko Score aufwiesen. Auch Patienten mit einer TIA hatten im Vergleich zu Patienten mit akuter zerebraler Ischämie ($p = 0,039$) und zurückliegendem Hirnfarkt ($p = 0,001$) ein signifikant geringeres Rezidivrisiko (zur Darstellung Gruppeneinteilung nach Duncan siehe Tabelle 4).

Tabelle 4:
ESRS in den Patientengruppen

Erkrankung	N	Durchschnittlicher ESRS in den Untergruppen aufgeteilt für Alpha = 0.05.		
Kontrolle	89	1,73		
TIA	28		2,39	
Akute zerebrale Ischämie	229			3,23
Zurückliegender Hirnfarkt	40			3,79

Post hoc Analyse nach Duncan

5.1.3. Ätiologie, Klinik und morphologisches Korrelat der akuten zerebralen Ischämie und TIA

Für alle Patienten mit einer akuten zerebralen Ischämie und TIA erfolgte die Einteilung nach potentiellen Ursachen anhand der TOAST-Kriterien (siehe Tabelle 5). Weiterhin wurde das Korrelat der akuten zerebralen Ischämie in der ZNS-Bildgebung mit cCT oder cMRT erfasst (siehe Tabelle 6).

Tabelle 5:
Patienten mit akuter zerebraler Ischämie und TIA eingeteilt nach TOAST-Kriterien

	TOAST	akute zerebrale Ischämie		TIA	
		Anzahl	Rel.	Anzahl	Rel.
Arteriosklerose mit > 50% Stenose	1	44	19,2 %	5	17,9 %
kardial embolisch	2	50	21,8 %	4	14,3 %
mikrovaskulär	3	42	18,3 %	11	39,3 %
andere definierte Ursache	4	13	5,7 %	2	7,1 %
ungeklärte Ätiologie oder konkurrierende Ursachen	5	80	34,9 %	6	21,4 %

Tabelle 6 :
Zerebrales Korrelat der akuten zerebralen Ischämie in der ZNS-Bildgebung

Infarktlokalisation / - grösse	Patientenzahl	%
kortikal	89	38,9
subkortikal	54	23,6
lakunär	38	16,6
kein Korrelat	48	21,0

Hirnstamminfarkte (n = 63) wurden je nach Korrelat im MRT entsprechend der anzunehmenden Pathogenese entweder in die Subgruppe lakunär oder subkortikal zugeordnet.

Das klinische Korrelat der akuten zerebralen Ischämie wurde mit Hilfe des Barthel-Index und NIH-Score bei Aufnahme und Entlassung bestimmt. Die jeweiligen Scores wurden für die weitere Analyse in folgende Bereiche (siehe Tabellen 7 und 8) eingeteilt.

Tabelle 7:
Klinische Behinderung nach Barthel-Index zum Aufnahme- und Entlassungszeitpunkt

Behinderung	Barthel-Index	Aufnahme	Entlassung
keine	90-100	40 (17,5%)	135 (59%)
leicht	70-90	12 (5,2%)	38 (16,6%)
mittel	50-70	24 (10,0%)	16 (6,9%)
schwer	30-50	32 (14,0%)	8 (3,4%)
sehr schwer	<30	119 (52%)	25 (10,9%)

n = 7 kein Barthel bei Entlassung

Tabelle 8:
Klinische Behinderung nach NIH-Score zum Aufnahme- und Entlassungszeitpunkt

Behinderung	NIH-Score	Aufnahme	Entlassung
minimal	0-5	121 (53,3%)	183 (80%)
leicht	6-10	79 (34,5%)	21 (9,2%)
mäßig	11-15	23 (10,0%)	11 (4,8%)
schwer	>16	6 (1,7%)	12 (2,4%)

n = 8 kein NIH bei Entlassung

Diese Daten wurden als Grundlage für weitere Berechnungen von möglichen Einflussgrößen auf den PADA-AI durch Untergruppen von Patienten mit akuter zerebraler Ischämie und TIA erhoben.

5.1.4. Komplikationen im Beobachtungszeitraum

Als Komplikationen wurden in der vorliegenden Studie folgende Ereignisse erfasst: Tod, progredientes neurologisches Defizit im Verlauf nach stationärer Aufnahme (progressive stroke), ohne Anhalt für eine erneute frische zerebrale Ischämie in einem anderen Stromgebiet, Blutungen aller Art und Rezidive einer akuten zerebralen Ischämie.

Im Untersuchungskollektiv verstarben im Beobachtungszeitraum 8 Patienten. 7 Patienten hatten initial eine akute zerebrale Ischämie (1 Patient eine Basilaristhrombose, 3 Patienten einen ausgedehnten Infarkt im

Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media, 1 Patient mit Hirninfarkt im Versorgungsgebiet der Arteria cerebri posterior, 2 Patienten eine Hirnstammischämie) erlitten, ein Patient eine akute intrazerebrale Blutung. Zwei Patienten verstarben an der Folge einer Aspirationspneumonie, fünf an den Folgen des Hirninfarktes, ein Patient an den Folgen der intrazerebralen Blutung.

Eine Zunahme des neurologischen Defizits (progressive stroke%) nach akuter zerebraler Ischämie (definiert als über mehr als 24 Stunden anhaltende Zunahme der initial bestehenden neurologischen Defizite ohne klinische und radiologische Hinweise auf eine erneute akute zerebrale Ischämie in einem neuen Hirnabschnitt) trat bei 25 Patienten auf. Davon hatten 8 Patienten einen ausgedehnten Hirnstamminfarkt (einmal bei Basilaristhrombose), 12 Patienten einen ausgedehnten Infarkt im Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media (davon 2 bei Verschluss der Arteria carotis interna), 2 Patienten einen ausgedehnten Kleinhirninfarkt und drei Patienten lakunäre Infarkte im Bereich der Capsula interna erlitten.

3 Patienten erlitten unter einer neu begonnenen Sekundärprophylaxe während des stationären Aufenthaltes eine erneute akute zerebrale Ischämie in einem anderen Hirnabschnitt als dem Akutereignis.

Bei 8 Patienten mit akuter zerebraler Ischämie kam es im Beobachtungszeitraum zu folgenden Blutungskomplikationen: 1 Patient erlitt eine Einblutung in eine akute zerebrale Ischämie im Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media unter einer PTT-gesteuerten i.v.-Therapie mit unfractioniertem Heparin, 1 Patient unstillbares Nasenbluten unter Phenprocoumon, 1 gastrointestinale Blutung unter ASS, 1 behandlungsbedürftige Blutung aus vorbestehenden Hämorrhoiden unter einer Therapie mit Clopidogrel, 1 Einblutung in die Harnblase unter einer Therapie mit Aspirin, 1 behandlungsbedürftige neu aufgetretene Blutung aus einem vorbestehendem Ulcus cruris unter Therapie mit Clopidogrel, 2 Patienten mit vermehrter subcutaner Hämatombildung nach Bagateltraumen . davon je einmal unter Therapie mit ASS und Clopidogrel. Akute Herzinfarkte oder akute periphere Verschlüsse traten im Beobachtungszeitraum im untersuchten Patientenkollektiv nicht auf.

5.1.5. Zeitpunkt der Bestimmung des PADA-AI

Die Bestimmung des PADA-AI erfolgte bei Patienten mit TIA und akuter zerebraler Ischämie zum frühest möglichen Zeitpunkt (siehe Tabelle 9) nach der stationären Aufnahme unter Berücksichtigung der vorgegebenen Untersuchungszeiten im Labor (siehe oben).

In einer statistischen Analyse (ANOVA) fand sich zwischen den Gruppen, eingeteilt nach Zeitpunkt der ersten Bestimmung des PADA-AI, kein signifikanter Unterschied ($p = 0,501$).

Tabelle 9 :
Zeitpunkt der ersten PADA-AI Bestimmung nach
akuter zerebraler Ischämie und TIA

Tage nach Ereignis	Anzahl	Prozent
0	104	40
1	96	36,9
2	29	11,3
3	17	6,5
> 3	14	5,3

5.1.6. PADA-Verlaufskontrolle unter Sekundärprophylaxe

Von den untersuchten 257 Patienten (siehe Tabelle 2, Seite 29) mit einer akuten zerebralen Ischämie oder TIA erfolgte bei 111 Patienten (43,2%) eine Verlaufskontrolle des PADA-AI unter der neu begonnenen Sekundärprophylaxe. Da die Auswahl der Sekundärprophylaxe nicht randomisiert erfolgte, kam es zu einem signifikanten Unterschied ($p = 0,000$) in der Höhe des initialen PADA-AI (siehe Tabelle 10) zwischen den Patientengruppen.

In der post hoc Analyse (Bonferroni) wurde nachgewiesen, dass Patienten mit einem höheren PADA-AI signifikant häufiger Clopidogrel ($p = 0,002$), PTT-gesteuert unfractioniertes i.v. Heparin (UFH) ($p = 0,001$) als sAggrenox[®] erhalten hatten.

Da sich bereits in den ersten Verlaufsuntersuchungen unter AGG und ASS bestätigt hatte, dass diese Substanzen erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die mit dem PADA-Test messbare Thrombozytenadhäsivität hatten, wurden seit diesem Zeitpunkt weitere Verlaufsuntersuchungen vornehmlich bei Patienten mit CLO als Sekundärprophylaxe durchgeführt.

Auch erhielten Patienten nach einer akuten zerebralen Ischämie oder TIA, die einen erhöhten PADA-AI aufwiesen (nach entsprechender Aufklärung zur Behandlung im Rahmen eines Heilversuches) eher CLO. Dies erschien unter dem Aspekt gerechtfertigt, dass CLO zur Sekundärprophylaxe von Patienten ohne pAVK nach akuter zerebraler Ischämie und TIA rein auf Grund der Behandlungskosten nicht empfohlen wird, nicht jedoch wegen fehlender Wirkung.

Auf den dadurch verursachten Bias wird an anderer Stelle (siehe 6.8. Einschränkungen der Studie) eingegangen.

Tabelle 10:
PADA-AI vor neu begonnener Sekundärprophylaxe

Medikation	Patientenzahl bei der eine Verlaufskontrolle erfolgte	durchschnittlicher PADA-AI vor neuer Medikation
ASS	22	56,2
sAggrenox [®]	10	47,2
Clopidogrel	53	64,7
PTT-gesteuertes i.v. Heparin (UFH)	24	64,8
Phenprocoumon	2	49,5

5.1.7 Test auf Normalverteilung der PADA-AI in den Patientengruppen

Die Daten des initialen PADA-AI wurden vor der weiteren statistischen Analyse auf Normalverteilung getestet (siehe Tabelle 11).

Der Test erfolgte unterteilt in die Subgruppen für die Erkrankungen (siehe Tabelle 2, Seite 29) mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest.

Es wurde für alle untersuchten Gruppen die Normalverteilung nachgewiesen.

Auf eine Prüfung auf Normalverteilung wurde in den sehr kleinen Patientengruppen (SVT n = 3, Vaskulitis n = 7, intrazerebrale Blutung n = 10) verzichtet.

Tabelle 11:
Normalverteilung in den Erkrankungsgruppen

Erkrankungsgruppe	Kolmogorov-Smirnov-Z
Kontrolle	0,541
akute zerebrale Ischämie	0,68
TIA	0,535
zurückliegende zerebrale Ischämie	0,46

5.2. PADA-AI in den Patientengruppen und Normkollektiv

In allen untersuchten Patientengruppen fanden sich Patienten mit im Vergleich zu den vom Hersteller genannten Normwerten (PADA-AI 30-70) deutlich erniedrigten oder deutlich erhöhten PADA-AI (siehe Grafik 3 und Tabelle 12). Die Mittelwerte des PADA-AI lagen außer in der Patientengruppe mit Sinusvenenthrombose alle innerhalb des vom Hersteller genannten Normbereiches.

Tabelle 12 :
PADA-AI bei Aufnahme in den Patientengruppen

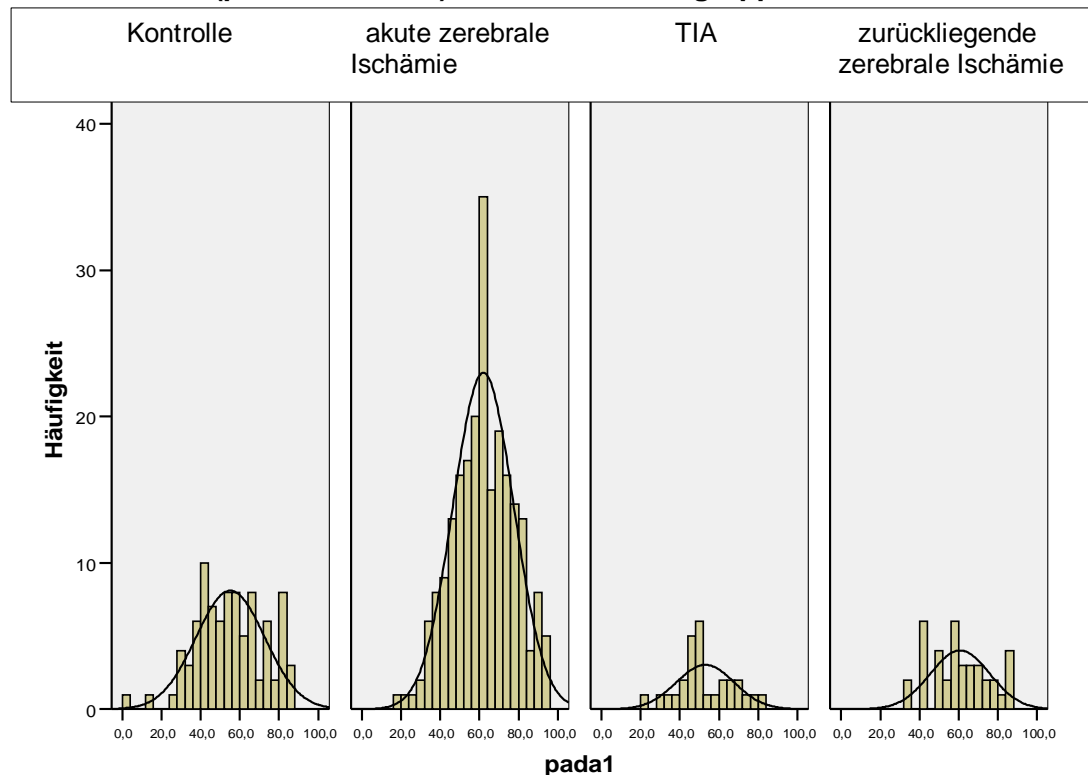
Patientengruppe	Mittelwert des PADA-AI	PADA-AI 95 % KI-Intervall Unter- / Obergrenze	PADA-AI Minimum	PADA-AI Maximum
Kontrolle	55,1	51,4/58,8	1,8	87,7
akute zerebrale Ischämie	61,9	59,9/64,0	17,8	95,5
TIA	52,1	47,3/58,6	21,4	80,2
zurückliegende zerebrale Ischämie	60,9	55,42/65,5	33,0	87,7
ICB	58,1	47,2/68,8	44,5	77,3
Vaskulitis	61,4	33,5/90,0	28,5	86,4
SVT	72,2		48,8	97,7

Die Patientengruppen „Sinusvenenthrombose“, „Vaskulitis“ und „intrazerebrale Blutung“ wurden wegen der zu geringen Patientenzahl in der weiteren statistischen Analyse nicht berücksichtigt.

Die Häufigkeitsverteilung der Höhe des initialen PADA-AI in den verbleibenden Patientengruppen, wie er in den weiteren Analysen zu Einflüssen auf den PADA-AI berücksichtigt wurde, ist in Grafik 1 dargestellt.

Grafik 1 :

Häufigkeitsverteilung (absolute Patientenzahl, y-Achse) der Höhe des PADA-AI bei Aufnahme (pada1; x-Achse) in den Patientengruppen



5.2.1. PADA-AI bei Komplikationen

Bei den verstorbenen Patienten (siehe 5.1.4. Seite 32) fand sich in der statistischen Analyse kein signifikanter Unterschied des durchschnittlichen PADA-AI bei stationärer Aufnahme im Vergleich zu den Patienten mit akuter zerebraler Ischämie (ANOVA $p = 0,195$). Einschränkungen in der Beurteilbarkeit der statistischen Analyse ergeben sich jedoch aus der sehr kleinen Anzahl von verstorbenen Patienten ($n = 8$).

Patienten mit einem ~~progressive stroke~~ Zunahme des neurologischen Defizits ohne nachweisbare neue zerebrale Ischämie in einem anderen Hirnabschnitt) hatten im Vergleich zu den Patienten mit akuter zerebraler Ischämie und der Kontrollgruppe einen signifikant höheren PADA-AI bei Aufnahme (ANOVA $p = 0,03$, Gruppenaufteilung nach Duncan siehe Tabelle 13).

Bei der Analyse wurden mögliche Einflüsse auf den PADA-AI durch Alter und Thrombozytenzahl (siehe Tabelle 16, Seite 40) berücksichtigt (univariates allgemeines lineares Modell $p = 0,014$).

Tabelle 13:

PADA-AI bei stationärer Aufnahme bei Patienten der Kontrollgruppe, Patienten mit akuter zerebraler Ischämie ohne progressive stroke und Patienten mit progressive stroke

Bezeichnung der Patientengruppe	N	PADA-AI	PADA-AI
Kontrolle	89	55,1	
Akute zerebrale Ischämie ohne progressive stroke	204	60,6	
Akute zerebrale Ischämie mit progressive stroke	25		67,8

Post hoc Analyse nach Duncan

Auf Grund der geringen Patientenzahl, die im Beobachtungszeitraum eine erneute akute zerebrale Ischämie erlitt (Frührezidiv), war eine statistische Analyse zum Zusammenhang zwischen PADA-AI und Rezidivhäufigkeit nicht möglich. Es erfolgt daher die Darstellung der Einzelergebnisse des PADA-AI bei stationärer Aufnahme in Tabelle 14.

Tabelle 14 :

PADA-AI bei Aufnahme und Sekundärprophylaxe bei zerebraler Rezidivischämie

Patient	PADA-AI bei Aufnahme	Sekundärprophylaxe bei Rezidiv
Pat. 1	49,2	Clopidogrel
Pat. 2	89,0	unfraktioniertes i.v. Heparin
Pat. 3	52,0	ASS

Eine statistische Analyse über den Einfluss der Höhe des PADA-AI in Bezug auf die Wahrscheinlichkeit von Blutungskomplikationen konnte nicht erfolgen, da die Zahl der Patienten mit Blutungskomplikationen sehr gering ($n = 8$) und die Gruppe durch die verwendete Sekundärprophylaxe inhomogen war. Es erfolgt daher die Analyse als Einzelfalldarstellung in Tabelle 15.

Tabelle 15 :
Einzelfalldarstellung der Blutungskomplikationen

Patient	Blutungsart	verwendete Sekundärprophylaxe zum Blutungszeitpunkt	PADA-AI bei Aufnahme	PADA-AI im Verlauf vor der Blutung
1	Einblutung in einen Mediainfarkt	unfraktioniertes Heparin i.v.	47,5	nicht bestimmt
2	Epistaxis	Phenprocoumon	28	nicht bestimmt
3	Gastrointestinale Blutung	ASS	40	nicht bestimmt
4	Hämorrhoidenblutung	Clopidogrel	35,0	13,5
5	Einblutung in die Harnblase	Aggrenox	42,0	40,1
6	Blutung eines Ulcus cruris	Clopidogrel	76,5	74,3
7	Vermehrte subcutane Hämatome nach Bagateltraumen	Clopidogrel	50,0	38,0
8	Vermehrte subcutane Hämatome nach Bagateltraumen	ASS	62,0	nicht bestimmt

5.3. Einflüsse auf den PADA-AI durch Laborwerte und Risikofaktoren

Um mögliche Einflüsse auf den Messwert PADA-AI zum Aufnahmezeitpunkt durch Laborwerte oder Risikofaktoren unabhängig von der zur stationären Einweisung führenden Erkrankung zu untersuchen, erfolgte die Bestimmung der Korrelation zwischen erstem bestimmten PADA-AI (sPADA1%) und anderen numerisch erfassten Messwerten (siehe Tabelle 16).

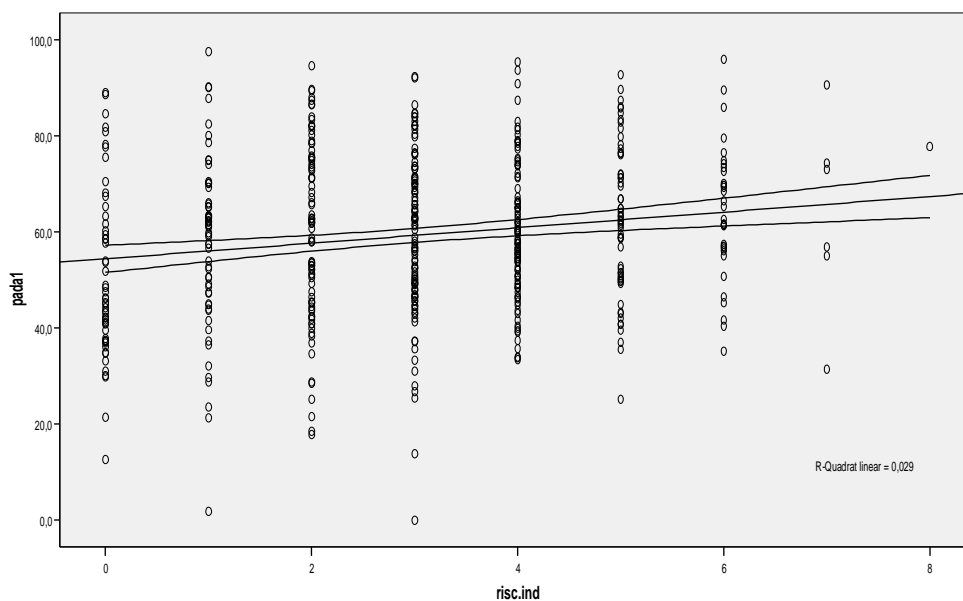
Höheres Lebensalter und ein erhöhtes Schlaganfallrezidivrisiko (Essener Stroke Rezidiv Score, siehe Grafik 2) sind verbunden mit einem signifikanten Anstieg des PADA-AI. Ein höherer PADA-AI ist mit einer niedrigeren Thrombozytenzahl assoziiert (siehe Grafik 3).

Für die anderen untersuchten Laborparameter fand sich kein signifikanter Zusammenhang mit der Höhe des PADA-AI

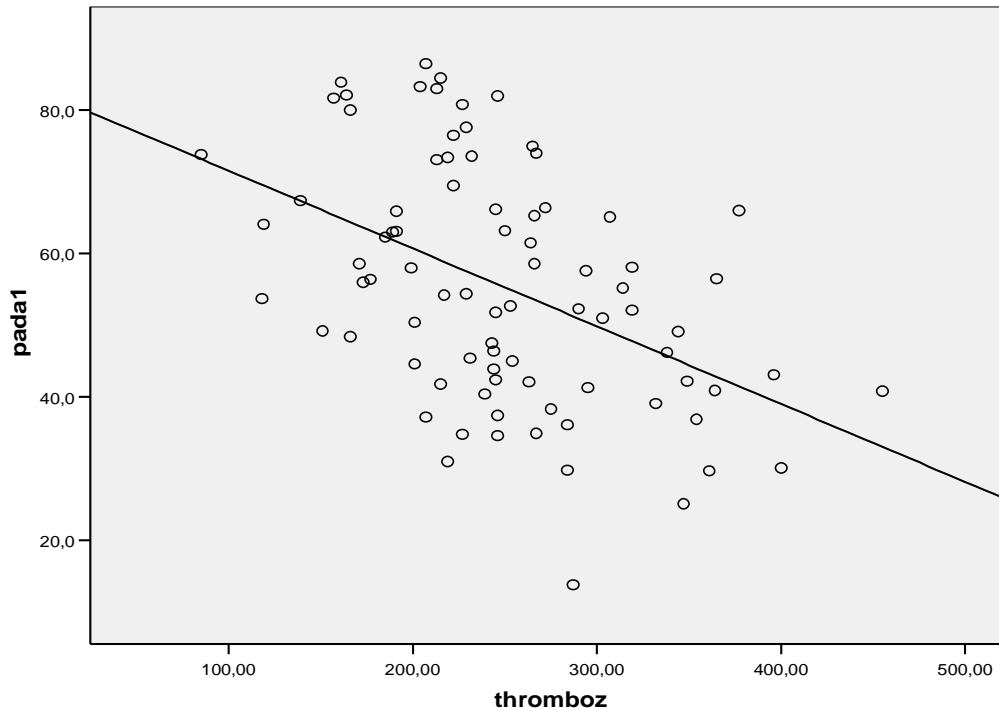
Tabelle 16 :
PADA-AI bei Aufnahme in Abhängigkeit von Alter, Risikofaktoren
und Laborwerten

Parameter	Analysierte Patientenzahl	p =	Korrelation
Alter	401	0,000	0,222
Alter nur Kontrollgruppe	89	0,004	0,302
Essener Stroke Risiko-Score	346	0,001	0,179
Thrombozytenzahl	401	0,000	- 0,208
Thrombozytenzahl nur Kontrollgruppe	89	0,000	- 0,457
HbA1c	90	0,871	
Fibrinogen	323	0,187	
Quick	401	0,95	
PTT	401	0,374	
Protein C global	240	0,638	
AT III (in Bereiche eingeteilt)	282	0,547	
Homocystein	114	0,705	
Cholesterin	333	0,706	
LDL	253	0,351	
BSG 1. Wert	276	0,316	
CRP	343	0,717	
IMT (mm)	278	0,215	
Nikotinabusus	388	0,73	

Grafik 2
Korrelation PADA-AI (pada1- y-Achse) im Verhältnis zur Höhe des Essener-
Stroke Risiko Score (risc.ind; numerisch - x Achse)



Grafik 3 :
Korrelation des PADA-AI (pada1í ; y-Achse) mit der Thrombozytenzahl
(thrombozí Gpt/l ; x-Achse) in der Kontrollgruppe



Weiterhin wurde der Einfluss von Begleiterkrankungen auf den PADA-AI mittels ANOVA untersucht (signifikante Ergebnisse siehe Tabelle 17).

Tabelle 17:
Begleiterkrankungen mit signifikantem Einfluss auf den PADA-AI

Risikofaktor / Begleiterkrankung	Merkmal vorhanden	Merkmal nicht vorhanden	p-Wert ANOVA	Art der Korrelation
KHK	272	117	0,037	Positiv
Hypertonie	107	294	0,007	Positiv
Intrakranielle Stenose im TCD (nur akute zerebrale Ischämie und TIA)	39	218	0,009	Positiv
Extrakranielle Stenose (nur akute zerebrale Ischämie und TIA)	57	200	0,016	Positiv
Migräne	46	355	0,006	Negativ

Für folgende Parameter fand sich keine Korrelation zwischen Merkmalsausprägung und Höhe des PADA-AI bei Aufnahme: Geschlecht ($p = 0,473$), Vorhandensein von Herzh thromben im TEE ($p = 0,63$), Spontan-Kontrast im linken Vorhof im TEE ($p = 0,99$), Nachweis eines PFO ($p = 0,672$), intermittierende absolute Arrhythmie ($p = 0,171$), permanente absolute Arrhythmie ($p = 0,278$), Myokardinfarkt in der Eigenanamnese ($p = 0,256$), Bypass-OP oder kardialer Stent ($p = 0,618$), periphere arterielle Verschlusskrankheit ($p = 0,087$, Trend zu positiver Korrelation), Diabetes mellitus ($p = 0,404$), insulinpflichtiger Diabetes mellitus ($p = 0,815$), Plaquenachweis (definiert als lokale Wandverdickung $> 1,5$ mm) in der Duplexsonografie der extracraniellen hirnversorgenden Gefä ß e ($p = 0,087$, Trend zu positiver Korrelation), ASS in der Vormedikation ($p = 0,747$), venöse Thrombose in der Eigenanamnese ($p = 0,645$), erhöhte BSG definiert als > 10 im ersten Wert) ($p = 0,397$) und pathologisch erhöhtes CRP (definiert als CRP > 5 mg/l) ($p = 0,936$).

Zusammenfassend fanden sich im untersuchten Kollektiv bei Aufnahme signifikant höhere PADA-AI bei älteren Patienten ($p = 0,000$), bei Patienten mit niedrigerer Thrombozytenzahl ($p = 0,000$), Patienten mit einem höheren Essener Stroke Risiko Score ($p = 0,001$), Patienten mit einer extra ($p = 0,016$)- oder intrakraniellen ($p = 0,009$) Stenose der hirnversorgenden Gefä ß e, Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung ($p = 0,037$) und Patienten mit arteriellem Hypertonus ($p = 0,007$). Ein Trend zu höheren PADA-AI fand sich für Patienten mit einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und Plaques in der Duplexsonografie der hirnversorgenden Gefä ß e. Patienten mit einer Migräne in der Eigenanamnese wiesen einen signifikant niedrigeren PADA-AI auf.

Auf Grund der Datenlage zum Zeitpunkt der Studienkonzeption war kein Einfluss von Alter und Thrombozytenzahl auf den PADA-AI anzunehmen. Nach den in Tabelle 16 dargestellten Ergebnissen erschien es jedoch sinnvoll, eine multivariate Analyse und Berücksichtigung der Einflussfaktoren Alter und Thrombozytenzahl durchzuführen. In dieser Berechnung (siehe Tabelle 18) konnte nachgewiesen werden, dass das Alter und die Thrombozytenzahl auch unabhängig voneinander die Höhe des PADA-AI beeinflussten.

Dieses Ergebnis wurde bei den nachfolgenden statistischen Berechnungen entsprechend berücksichtigt.

Tabelle 18:

Beeinflussung des PADA-AI bei Aufnahme durch die Parameter $\hat{\text{Alter}}$ und $\hat{\text{Thrombozytenzahl}}$

Untersuchte Gruppe	Berechnete Signifikanz p der Gruppe in Bezug auf die Höhe des PADA-AI
Modell insgesamt	0,000
Thrombozytenzahl	0,001
Alter	0,000

Univariate ALM

Die übrigen Parameter mit signifikantem Einfluss auf die Höhe des PADA-AI wurden bereits in der ätiologischen Zuordnung der akuten zerebralen Ischämie oder TIA berücksichtigt.

5.4. PADA-AI in Abhängigkeit von der Patientengruppe

Analysiert wurde die Frage, ob zwischen den Patientengruppen ein Unterschied in der Höhe des PADA-AI bei stationärer Aufnahme vorlag. Es erfolgte eine univariate Analyse (ANOVA) entsprechend dem Studienprotokoll.

Es fand sich ein signifikanter Unterschied im PADA-AI zwischen den Patientengruppen von $p = 0,001$.

In der post hoc-Analyse nach Bonferroni fand sich ein signifikant höherer PADA-AI für Patienten mit einer akuten zerebralen Ischämie im Vergleich mit der Kontrollgruppe ($p = 0,004$) und im Vergleich zu Patienten mit einer TIA ($p = 0,028$). Zwischen den anderen Gruppen fand sich kein signifikanter Unterschied.

Auch nach Berücksichtigung der Einflüsse auf den PADA-AI durch die Parameter $\hat{\text{Alter}}$ und $\hat{\text{Thrombozytenzahl}}$ in einer univariaten ALM fand sich eine signifikante Beeinflussung des PADA-AI durch die zur Einweisung führende Erkrankung ($p = 0,02$) (siehe Tabelle 19, Grafik 4).

Grafik 4:
PADA-AI (pada1, y-Achse) bei stationärer Aufnahme

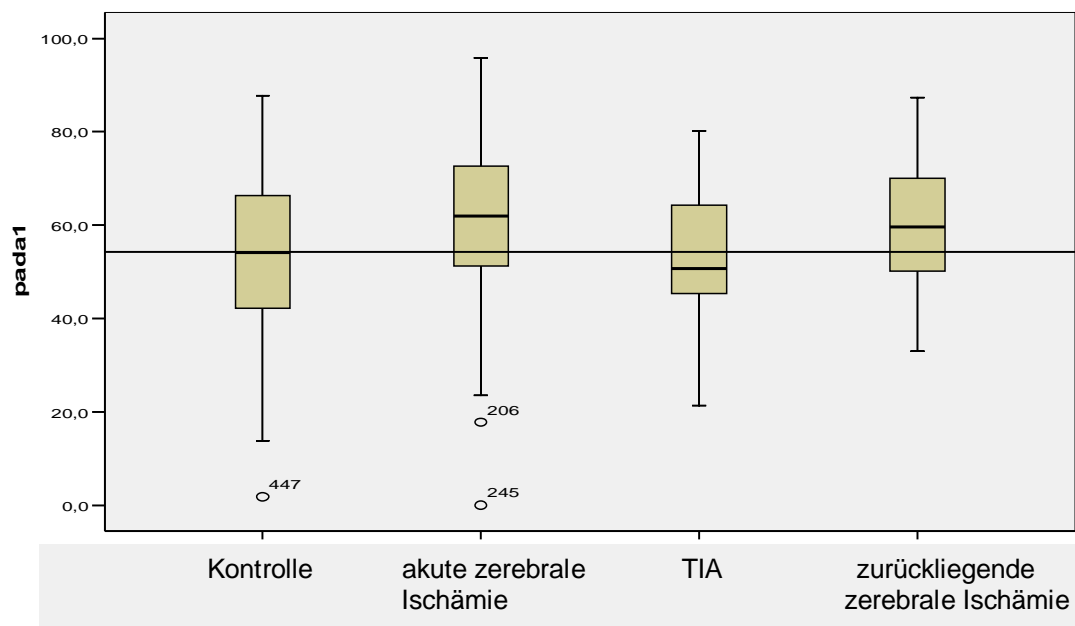


Tabelle 19 :
Höhe PADA-AI in Abhängigkeit von Erkrankung, Alter und Thrombozytenzahl

Variable	p in Bezug auf Beeinflussung des PADA-AI
gesamtes Modell	0,000
Thrombozytenzahl	0,001
Alter	0,003
Erkrankung	0,02

univariate ALM

Zusammenfassend fand si ch auch unter Berücksichtigung von Alter und Thrombozytenzahl ein signifikant höherer PADA-AI bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie im Vergleich zu Patienten mit einer TIA und der Kontrollgruppe.

5.5. PADA-AI in Abhängigkeit von der Subgruppe der akuten zerebralen Ischämie und TIA

Analysiert wurde die Frage, ob der PADA-AI eine Abhängigkeit von der Ätiologie (eingeteilt nach TOAST-Kriterien), dem zerebralen Korrelat in der ZNS-Bildgebung oder der klinischen Symptomatik der zur stationären Aufnahme führenden akuten zerebralen Ischämie oder TIA zeigt.

5.5.1. PADA-AI und Ätiologie nach TOAST-Kriterien

Es wurde mit Hilfe einer ANOVA untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen Höhe des initialen PADA-AI und der Ursache der akuten zerebralen Ischämie und TIA nach TOAST-Kriterien besteht. Als Vergleichsgruppe diente die Kontrollgruppe.

Verglich man den initialen PADA-AI zwischen den ätiologischen Gruppen nach TOAST-Kriterien bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie und TIA, fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,001$). In der post hoc Analyse nach Bonferroni fand sich ein signifikant erhöhter PADA-AI bei Patienten mit einer akuten zerebralen Ischämie / TIA in Folge einer $> 50\%$ Stenose der verantwortlichen hirnersorgenden Arterie (TOAST 1; $p = 0,039$) und Patienten mit ungeklärter Ätiologie / konkurrierenden Ursachen (TOAST 5; $p = 0,016$) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Weiterhin fand sich ein Trend zu einem niedrigeren PADA-AI bei Patienten mit einem mikrovaskulären Hirninfarkt (TOAST 3, $p = 0,067$) im Vergleich zu Patienten aus der Gruppe sTOAST1% (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20 :

PADA-AI und TOAST bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie und TIA

TOAST	Bezeichnung der Ätiologie	N	PADA-AI Subgruppe 1	PADA-AI Subgruppe 2
	Kontrolle	89	55,1	
3	mikrovaskulär	52	54,5	
4	andere definierte Ätiologie	15	57,2	57,2
2	kardial	52	62,2	62,2
1	$> 50\%$ Stenose	47		63,9
5	konkurrierende Ursachen oder ungeklärt	85		63,2

Post hoc Analyse nach Duncan

Unter Berücksichtigung der erkrankungsunabhängigen Einflüsse von Thrombozytenzahl und Alter auf den PADA-AI erfolgte eine zusätzliche univariate ALM (Tabelle 21) mit Alter und Thrombozytenzahl als Kofaktoren.

Tabelle 21 :
Höhe PADA-AI in Abhängigkeit von TOAST, Alter und Thrombozytenzahl

Variable	p in Bezug auf Beeinflussung des PADA-AI
gesamtes Modell	0,000
Thrombozytenzahl	0,001
Alter	0,001
TOAST (mit TIA)	0,206

Univariate ALM

Der mögliche Einfluss der Ätiologie nach TOAST-Kriterien auf den PADA-AI ließ sich unter Berücksichtigung der Einflüsse von Alter und Thrombozytenzahl nicht mehr nachweisen ($p = 0,206$).

Bei dieser Analyse ist jedoch zu beachten, dass die Patienten nach TIA mit berücksichtigt wurden, die im Vergleich zu Patienten mit akuter zerebraler Ischämie einen signifikant erniedrigten PADA-AI aufwiesen. Es ist daher möglich, dass bei der akuten zerebralen Ischämie andere Einflüsse auf den PADA-AI vorliegen als bei der TIA. Daher erschien es aus pathophysiologischer Sicht sinnvoll, die Patienten mit akuter zerebraler Ischämie separat zu analysieren.

Verglich man die Höhe des initialen PADA-AI zwischen den ätiologischen Gruppen nach TOAST-Kriterien bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie unter Berücksichtigung der Kontrollgruppe, so fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,002$). In der post hoc-Analyse nach Bonferroni konnte nachgewiesen werden, dass die Patienten mit akuter zerebraler Ischämie mit $> 50\%$ Stenose der hirnersorgenden Arterie (TOAST 1, $p = 0,04$) und Patienten mit akuter zerebraler Ischämie mit ungeklärter Ätiologie / konkurrierenden Ursachen (TOAST 5, $p = 0,004$) einen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhten PADA-AI aufwiesen (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22 :**PADA-AI und TOAST bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie**

TOAST	Bezeichnung der Ätiologie	N	PADA-AI Subgruppe 1	PADA-AI Subgruppe 2
	Kontrolle	89	55,1	
3	mikrovaskulär	41	56,5	56,5
4	andere def. Ätiologie	13	58,4	58,4
2	kardial	48	62	62
1	> 50 % Stenose	42		64,2
5	Konkurrierende Ursachen oder ungeklärt	79		64,3

Post hoc Analyse nach Duncan

Unter Berücksichtigung der erkrankungsunabhängigen Einflüsse von Thrombozytenzahl und Alter auf den PADA-AI erfolgte eine zusätzliche univariate ALM mit Alter und Thrombozytenzahl als Kofaktoren.

Unter Berücksichtigung der Einflüsse auf den PADA-AI durch Alter und Thrombozytenzahl ließ sich zwar keine signifikante Beeinflussung des PADA-AI durch eine ätiologische Subgruppe von Patienten mit akuter zerebraler Ischämie, eingeteilt nach TOAST-Kriterien, nachweisen (siehe Tabelle 23), allerdings fand sich jedoch ein starker Trend ($p = 0,054$) zu einem höheren PADA-AI bei Patienten mit einer akuten zerebralen Ischämie in Folge einer Arteriosklerose mit > 50 % Stenose (TOAST 1) und konkurrierenden Ursachen oder ungeklärter Ätiologie (TOAST 5).

Tabelle 23 :**PADA-AI in Abhängigkeit von TOAST, Alter und Thrombozytenzahl**

Variable	p in Bezug auf Beeinflussung des PADA-AI
gesamtes Modell	0,000
Thrombozytenzahl	0,000
Alter	0,06
TOAST (ohne TIA)	0,054

Univariate ALM

5.5.2. PADA-AI und zerebrales Korrelat in Bildgebung

Für alle Patienten mit akuter zerebraler Ischämie wurde das zerebrale morphologische Korrelat (Hirnfarktmuster) in der Bildgebung (CT oder MRT) erfasst und eine Unterteilung entsprechend den Vorschlägen von Ringelstein (Ringelstein E.B. und Weiller C. 1990) vorgenommen. In der statistischen Analyse wurden die Patienten der Kontrollgruppe wie bei der ätiologischen Zuordnung mit berücksichtigt.

Es fand sich in der ANOVA ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,001$). In der Post hoc Analyse nach Bonferroni fand sich ein signifikant erhöhter PADA-AI bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie mit nachweisbaren kortikalen ($p = 0,001$) und subkortikalen Läsionen ($p = 0,028$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24:

PADA-AI und zerebrales Korrelat bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie

Läsion in der Bildgebung	N	PADA-AI Subgruppe 1	PADA-AI Subgruppe 2
Kontrolle	89	55,1	
mikrovaskulär (<1,5 cm)	38	57,1	
kein Korrelat	45	59,2	59,2
subkortikal	53		63,5
kortikal			64,3

Post hoc-Analyse nach Duncan

Unter Berücksichtigung der erkrankungsunabhängigen Einflüsse von Thrombozytenzahl und Alter auf den PADA-AI erfolgte eine zusätzliche univariate ALM mit Alter und Thrombozytenzahl als Kofaktoren (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25:

PADA-AI in Abhängigkeit von zerebralem Korrelat, Alter und Thrombozytenzahl

Variable	p in Bezug auf Beeinflussung des PADA-AI
gesamtes Modell	0,000
Thrombozytenzahl	0,000
Alter	0,016
zerebrales Korrelat	0,006

Univariate ALM

Der Einfluss des zerebralen Korrelates der akuten Ischämie in der Bildgebung auf den PADA-AI lässt sich auch unter Berücksichtigung der Einflüsse von Alter und Thrombozytenzahl nachweisen ($p = 0,006$).

5.5.3. PADA-AI und Schwere der Klinik nach Barthel-Index und NIH-Score

Es wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen Höhe des initialen PADA-AI und der Schwere der Klinik bei Aufnahme (nach Barthel-Index und NIH-Score, beide zur besseren statistischen Analyse in Bereiche eingeteilt) und der Änderung des klinischen Befundes zum Zeitpunkt der Entlassung besteht. In der Analyse fand sich kein Anhalt für eine Beeinflussung der Höhe des initialen PADA-AI durch die Schwere der Behinderung (Barthel-Index ANOVA $p = 0,506$; NIH-Score ANOVA $p = 0,404$). Für den klinischen Verlauf, gemessen mit der Änderung des Barthel-Index bis zu Entlassung, fand sich keine Korrelation (Korrelation nach Pearson 0,097) zur Höhe des PADA-AI zum Aufnahmezeitpunkt.

5.6. Einflüsse der Sekundärprophylaxe auf den PADA-AI

Es wurde untersucht, ob sich der PADA-Test zum ~~sd~~drug monitoring% eignet. Dazu wurde bei 111 Patienten mit akuter zerebraler Ischämie und TIA die Änderung des PADA-AI nach neu begonnener Sekundärprophylaxe analysiert.

5.6.1. ASS

Es wurde bei 22 Patienten der PADA-Wert im Verlauf nach neu begonnener Sekundärprophylaxe mit ASS 100 mg/d bestimmt, bei 4 Patienten war eine Bestimmung zu drei Zeitpunkten möglich. Unter einer neu begonnenen Sekundärprophylaxe mit ASS kam es im Verlauf zu keiner signifikanten Änderung des PADA-AI (siehe Tabelle 26).

Tabelle 26 :

Änderung des PADA-AI unter neu begonnener Sekundärprophylaxe mit ASS

PADA Bestimmung	Anzahl	Tage nach Ischämie im Mittel (Min/Max)	PADA-AI (bei PADA1 für beide Gruppen)	T-Wert und Signifikanz (2-seitig) T-Test bei gepaarten Stichproben im Vergleich zu PADA1 (vor Beginn der neuen Prophylaxe)
PADA1	22	2 (0/6)	58,0 / 65,4	
PADA2	22	7 (4 /14)	50,6	T = 1,378; p = 0,183
PADA3	4	18 (9/45)	64,3	T = 0,104; p = 0,923

Gepaarter T-Test

5.6.2. Aggrenox

Es wurde bei 10 Patienten die Änderung des PADA-AI im Verlauf nach neu begonnener Sekundärprophylaxe mit ~~s~~Aggrenox%(Kombination von ASS 2 x 25 mg/d und retardiertem Dipyridamol 2 x 200mg/d) bestimmt, bei 2 Patienten war eine Bestimmung zu drei Zeitpunkten möglich. Eine Änderung des PADA-AI ließ sich unter der neu begonnenen Sekundärprophylaxe mit ~~s~~Aggrenox% nicht nachweisen (siehe Tabelle 27).

Tabelle 27 :

PADA-AI unter neu begonnener Sekundärprophylaxe mit ~~b~~Aggrenoxí

PADA Bestimmung	Anzahl	Tage nach Ischämie im Mittel (Min/Max)	PADA-AI (bei PADA1 für beide Gruppen)	T-Wert und Signifikanz (2-seitig) T-Test bei gepaarten Stichproben im Vergleich zu PADA1 (vor Beginn der neuen Prophylaxe)
PADA1	10	1 (0/2)	47,3 /43,3	
PADA2	10	6 (3/12)	42,5	T = 0,617; p = 0,553
PADA3	2	9 (8/10)	50,0	T = -0,382; p = 0,767

Gepaarter T-Test

5.6.3. Clopidogrel

Es wurde bei 53 Patienten die Änderung des PADA-AI im Verlauf nach neu begonnener Sekundärprophylaxe mit Clopidogrel bestimmt, bei 19 Patienten war eine Bestimmung zu drei Zeitpunkten möglich.

Unter der Sekundärprophylaxe mit Clopidogrel kam es innerhalb eines Zeitraumes von durchschnittlich 5 Tagen zu einem signifikanten ($p = 0,000$) Abfall der Höhe des PADA-Wertes (siehe Tabelle 28, Grafik 5).

Diese Veränderung ist bereits bei der ersten Kontrolle nachzuweisen und zeigt im weiteren Verlauf nach durchschnittlich 11,5 Tagen keine weitere signifikante Änderung.

Tabelle 28

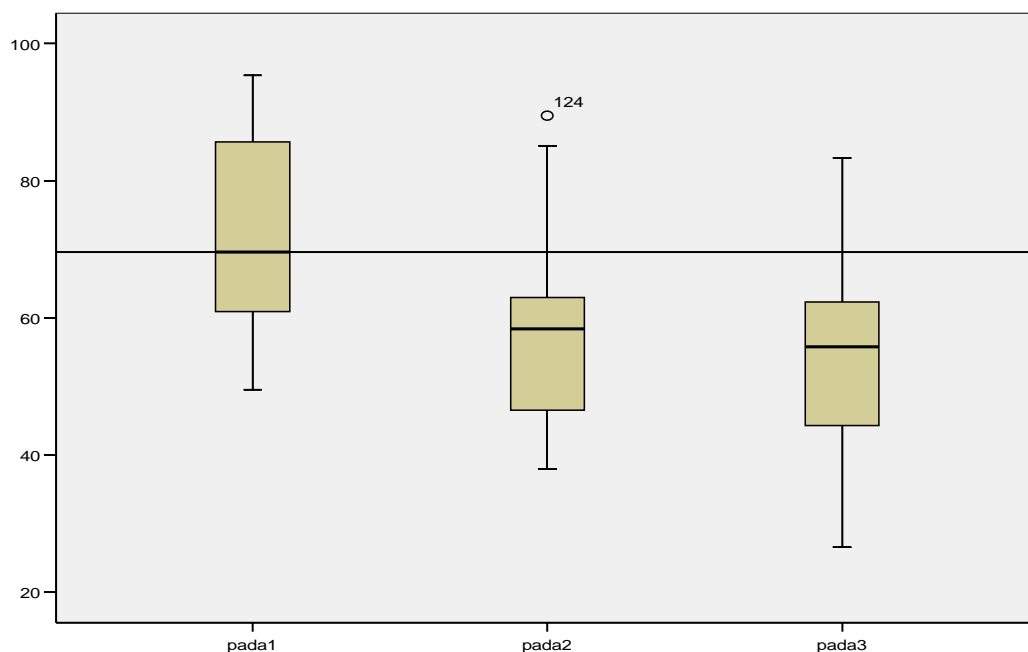
PADA-AI im Verlauf unter neu begonnener Sekundärprophylaxe mit Clopidogrel

PADA Bestimmung	Anzahl	Tage nach Ischämie im Mittel (Min/Max)	PADA-AI (bei PADA1 für beide Gruppen)	T-Wert und Signifikanz (2-seitig) T-Test bei gepaarten Stichproben im Vergleich zu PADA1 (vor Beginn der neuen Prophylaxe)
PADA1	53	0,1 (0/1)	64,2 / 71,4	
PADA2	53	5 (1/36)	50,1	$T = 5,855$; $p = 0,000$
PADA3	19	11,5 (3/90)	53,5	$T = 4,239$; $p = 0,000$

Gepaarter T-Test

Grafik 5 :

Verlauf der Höhe des PADA-AI (y-Achse) unter neu begonnener Sekundärprophylaxe mit Clopidogrel



Box-blot, (bei 53 Patienten mit zwei Bestimmungen und 19 Patienten mit drei Bestimmungen)

Zusätzlich erfolgte eine Analyse der individuellen Änderung des PADA-AI. Die Höhe der Änderung des PADA-AI nach neu begonnener Sekundärprophylaxe mit Clopidogrel zeigte im untersuchten Kollektiv größere interindividuelle Unterschiede (siehe Tabelle 29). Eine Abnahme des PADA-AI von > 10 ließ sich bei 53,7 % der Patienten nachweisen.

Tabelle 29:
Häufigkeit der Änderung des PADA-AI unter Clopidogrel

Abnahme des PADA-AI im Verlauf	Häufigkeit n	Prozent
(+) -10	25	46,3
10-20	11	20,4
20-30	9	16,7
30-40	3	5,6
40-50	3	5,6
50-60	2	3,7
>60	1	1,9
Gesamt	53	100,0

Deskriptive Statistik, eingeteilt in Gruppen mit einer Änderung jeweils um 10

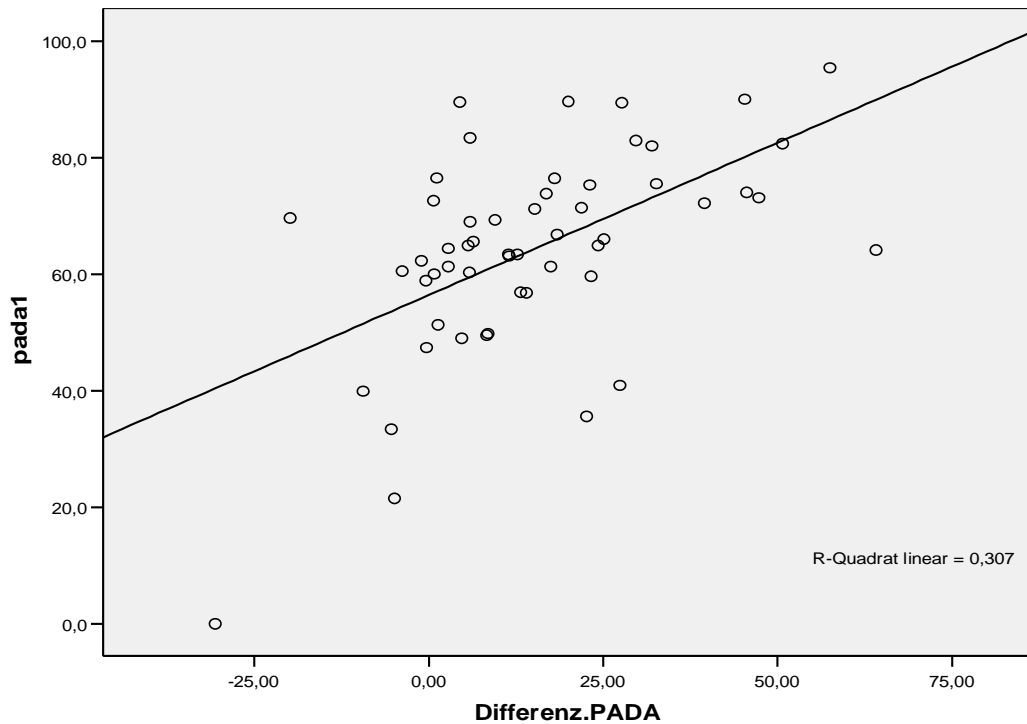
Es wurden statistische Berechnungen angeschlossen, um mögliche Ursachen für das unterschiedliche Ansprechen auf die Medikation mit Clopidogrel zu analysieren (siehe Tabelle 30).

Zusammenfassend ließ sich bei Patienten mit einem initial höheren PADA-AI ($p = 0,000$, siehe auch Grafik 6), Patienten mit einem geringerem ~~s~~Essener Stroke Rezidiv Score (ESRS, $p = 0,008$, siehe auch Grafik 7) und jüngeren Patienten ($p = 0,01$, siehe auch Grafik 8) eine stärkere Abnahme des PADA-AI unter einer neu begonnenen Medikation mit Clopidogrel nachweisen. Eine 300 mg loading dose führte im untersuchten Kollektiv innerhalb von 5 Tagen zu keiner anderen Beeinflussung des PADA-AI als eine initiale Standarddosis Clopidogrel über 5 Tage.

Tabelle 30:
Einflussfaktoren auf die Höhe der Änderung des PADA-AI nach Clopidogrel

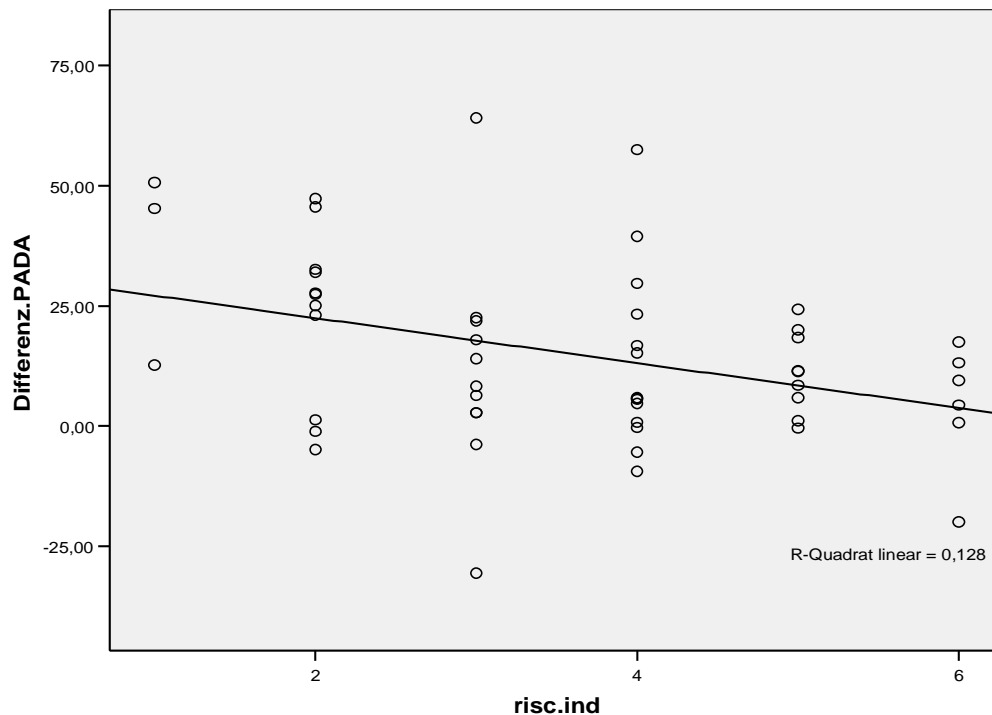
Parameter	Signifikanz	Bemerkung
Einfluss einer 300 mg loading dose%	ANOVA p = 0,179	eine loading dose% erhielten 23 Patienten, die Bestimmung des 2. PADA-AI erfolgte bei allen Patienten nach durchschnittlich 5 Tagen
Höhe des sEssener Stroke Rezidiv Score%	Korrelation nach Pearson -0,358, Signifikanz p = 0,008	
Alter	Korrelation nach Pearson -0,347, Signifikanz p = 0,01	
Höhe des PADA-AI vor Beginn der Sekundärprophylaxe	Korrelation nach Pearson 0,554, Signifikanz p = 0,000	
Thrombozytenzahl	p = 0,14	Keine Korrelation
Geschlecht	p = 0,23	Keine Korrelation
TOAST-Kriterien	p = 0,82	Keine Korrelation
mögliche arteriosklerotische Genese	p = 0,54	Keine Korrelation
zerebrales Korrelat in der Bildgebung	p = 0,53	Keine Korrelation
neu begonnene Statintherapie	p = 0,45	Keine Korrelation
vorbestehende Statintherapie	p = 0,88	Keine Korrelation
Hypertonie	p = 0,56	Keine Korrelation
Diabetes mellitus	p = 0,36	Keine Korrelation
Stenose der hirnversorgenden Gefäße	p = 0,76	Keine Korrelation
Migräne	p = 0,35	Keine Korrelation
Grad der Behinderung nach NIH Score	p = 0,25	Keine Korrelation

Grafik 6:
Änderung des PADA-AI im Verlauf unter Clopidogrel in Abhängigkeit von der Höhe des initialen PADA-AI



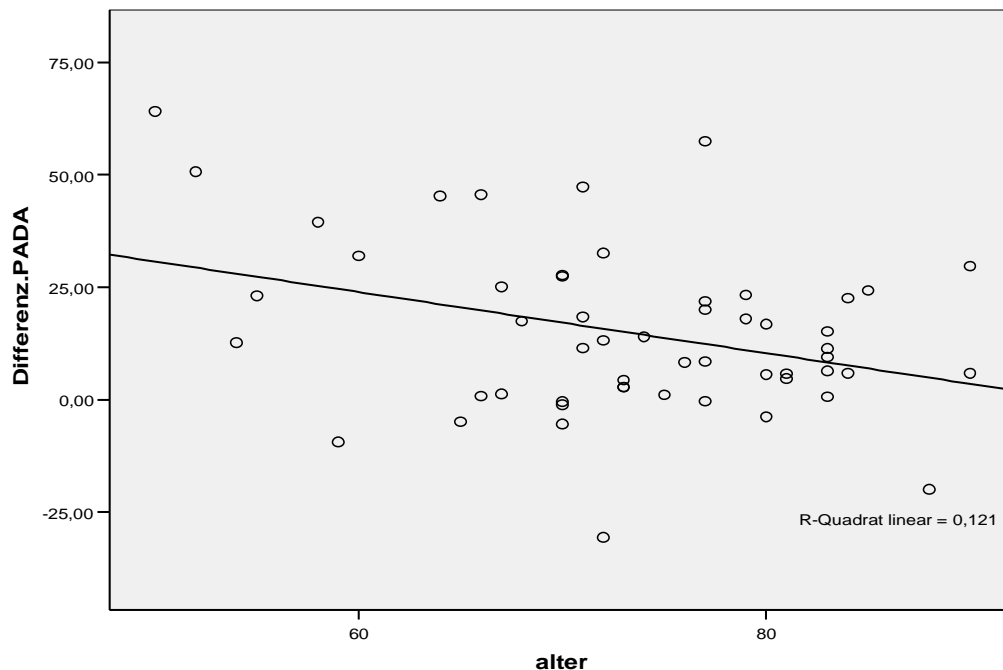
Darstellung der Korrelation, Änderung des PADA-AI = Δ Differenz.PADA% (x-Achse) und der Höhe des ersten PADA-AI (y-Achse pada1%)

Grafik 7:
Änderung des PADA-AI im Verlauf unter Clopidogrel in Abhängigkeit vom ESRS



Darstellung der Korrelation, Änderung des PADA-AI = Δ Differenz.PADA% (y-Achse) und der Höhe des ESRS (risc.ind% x-Achse)

Grafik 8:
Änderung des PADA-AI im Verlauf unter Clopidogrel in Abhängigkeit des Alters



Darstellung der Korrelation, Änderung des PADA-AI = Δ Differenz.PADA% (y-Achse) und dem Alter der Patienten

5.6.4. Phenprocoumon (PHEN)

Es wurde bei 2 Patienten die Änderung des PADA-AI im Verlauf nach neu begonnener Sekundärprophylaxe mit Phenprocoumon bestimmt. Die statistische Analyse erfolgte mit einem gepaarten T-Test. Unter der Therapie mit Phenprocoumon kommt es bei der untersuchten kleinen Patientengruppe ($n = 2$) zu einem nicht signifikanten, leichten Anstieg ($p = 0,082$) des PADA-AI (siehe Tabelle 31).

Tabelle 31 :
PADA-AI im Verlauf unter neu begonnener Sekundärprophylaxe mit Phenprocoumon

PADA Bestimmung	Anzahl	Tage nach Ischämie im Mittel (Min/Max)	PADA-AI	T-Wert und Signifikanz (2-seitig) T-Test bei gepaarten Stichproben im Vergleich zu PADA1 (vor Beginn der neuen Prophylaxe)
PADA1	2	3 (0/6)	49,5	
PADA2	2	8 (7/9)	58,0	$T = -7,727$; $p = 0,82$

Gepaarter T-Test

5.6.5. PTT-gesteuerte i.v.-Therapie mit unfractioniertem Heparin (UFH)

Es wurde bei 24 Patienten die Änderung des PADA-AI im Verlauf nach neu begonnener Sekundärprophylaxe mit UFH bestimmt, bei 6 Patienten war eine Bestimmung zu drei Zeitpunkten möglich (siehe Tabelle 32, Grafik 9).

Tabelle 32:

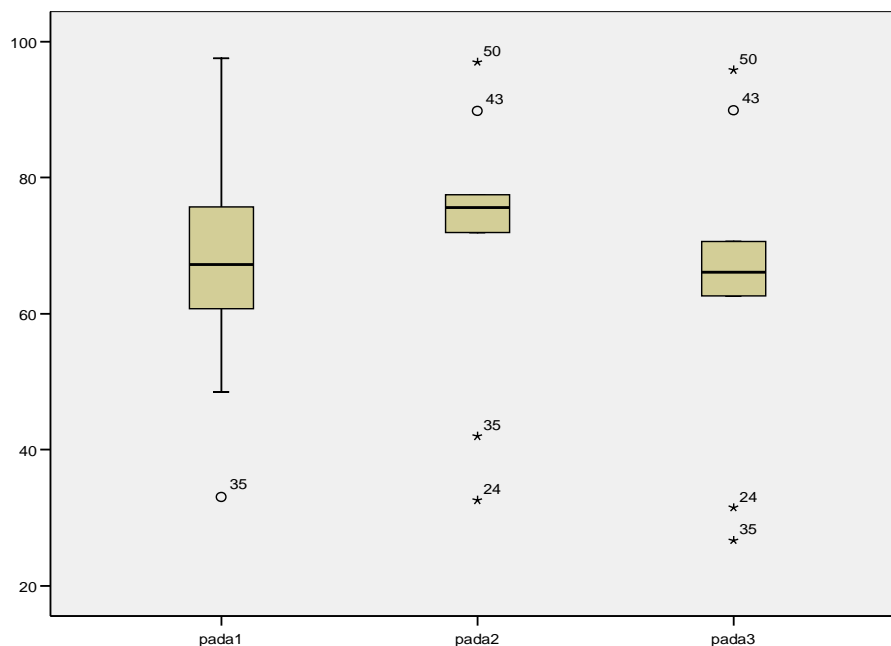
PADA-AI im Verlauf unter neu begonnener Sekundärprophylaxe mit UFH

PADA Bestimmung	Anzahl	Tage nach Ischämie im Mittel (Min/Max)	PADA-AI (bei PADA1 für beide Gruppen)	T-Wert und Signifikanz (2-seitig) T-Test bei gepaarten Stichproben im Vergleich zu PADA1 (vor Beginn der neuen Prophylaxe)
PADA1	24	1,5 (0/8)	63,3 / 68,2	
PADA2	24	5,5(1/13)	64,9	T = -0,552; p = 0,586
PADA3	6	7,5 (5/12)	65,0	T = 0,298; p = 0,777

Gepaarter T-Test

Grafik 9:

Verlauf der Höhe des PADA-AI (y-Achse) unter UFH bei 24 Patienten mit zwei Bestimmungen und 6 Patienten mit drei Bestimmungen des PADA-AI



Box-blot Darstellung; (PADA1 bei markierten Einzelfällen: Pat. 24: 75.5; Pat. 43: 97,7; Pat. 50: 67,2)

Unter einer neu begonnenen Sekundärprophylaxe mit einer PTT-gesteuerten i.v.-Therapie mit unfractioniertem Heparin kommt es bei der Mehrzahl der Patienten zu keiner signifikanten Änderung des PADA-AI im Verlauf (siehe Tabelle 34). In Einzelfällen kommt es zu einer Zunahme (Pat. 50) oder Abnahme (Pat. 24) des PADA-AI.

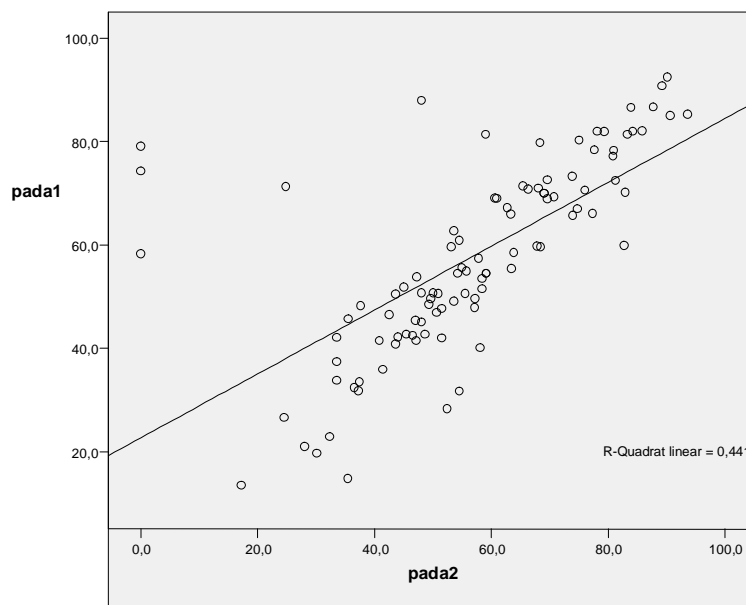
5.7. Doppelbestimmung des PADA-AI zur Konstanzprüfung

Die Konstanzprüfung erfolgte zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der Messergebnisse und zur Bestimmung der Spezifität des PADA-Testes im klinischen Alltag. Die Untersuchung erfolgte bei 100 zusätzlich untersuchten Probanden, die nicht in der Studie zum Einfluss von Erkrankungen auf den PADA-AI berücksichtigt wurden.

5.7.1. Korrelation PADA 1 und PADA 2

Die Korrelation zwischen PADA1 und PADA2 im Rahmen der Doppelbestimmung lag in einer Berechnung nach Pearson bei $p = 0,664$ mit einer zweiseitigen Signifikanz von 0,000 (Grafik 10).

Grafik 10:
Korrelation PADA1/PADA2 bei Konstanzprüfung

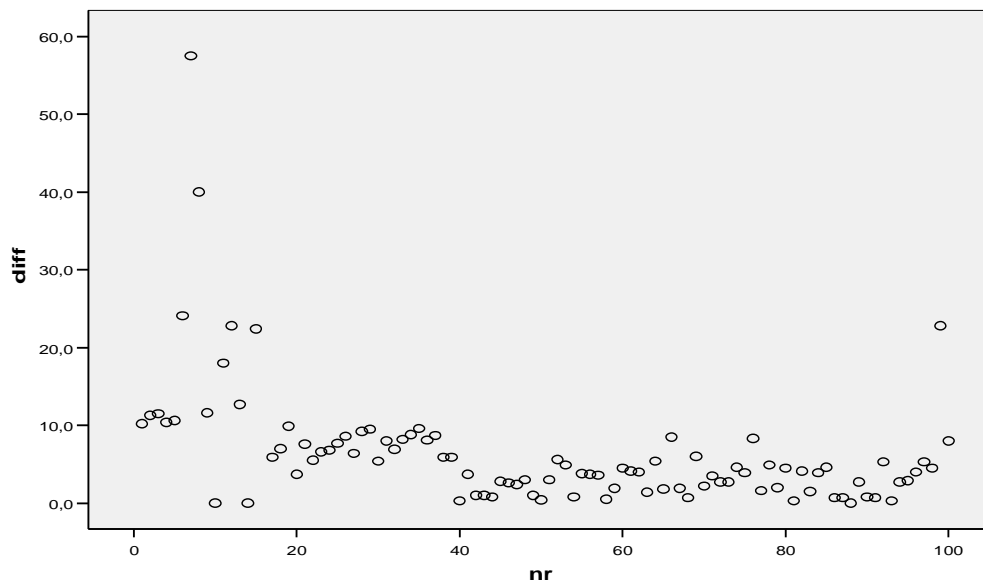


Dabei lagen bei 87 % der Patienten die Werte innerhalb der vom Hersteller angegebenen Toleranzbreite von 2 Standardabweichungen (Produktinformation Fa. HAEMOSYS), bei 3 % der Probanden war keine Doppelbestimmung möglich.

In Einzelfällen kam es zu ausgeprägten Abweichungen zwischen den Doppelbestimmungen (siehe Grafik 11).

Grafik11:

Darstellung der Differenzen zwischen PADA 1 und PADA2 (Δ diff; y - Achse) anhand der Probandennummer (nr, x-Achse)



5.7.2. Bestimmung der Abhängigkeit des Messergebnisses von der Reihenfolge der Blutabnahme

Es wurde zusätzlich untersucht, ob die Höhe des PADA-AI von der Reihenfolge der Blutabnahme abhängig ist, das heißt, ob es einen Unterschied gibt, wenn bei Blutabnahme mehrerer Röhrchen, wie bei Routineblutentnahmen üblich, das PADA-Röhrchen zuerst oder zuletzt gefüllt wird. Dabei fand sich ein niedrigerer Wert für die erste Probe ($PADA1 < PADA2$) bei 58 %, ein niedrigerer Wert für die zweite Probe ($PADA2 < PADA1$) bei 39 % und bei 3 % war keine Doppelbestimmung möglich. Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (gepaarter T-Test $p = 0,317$).

6. Diskussion

Ziel der Untersuchung war die Beantwortung der Frage, ob mit dem PADA-Test eine Änderung der Thrombozytenaktivierung bei Patienten mit einer akuten zerebralen Ischämie nachgewiesen werden kann. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit die Beeinflussung der Messwerte (PADA-AI) durch fakultative Begleitfaktoren und eine neu begonnene Sekundärprophylaxe analysiert sowie die Reproduzierbarkeit der Messwerte geprüft.

Die Verteilung der hier untersuchten Patienten mit akuter zerebraler Ischämie nach TOAST-Kriterien entsprach annähernd dem Verteilungsmuster in der Deutschen Schlaganfall Datenbank (Grau A. et al. 2001).

6.1. Einflüsse auf den PADA-AI

In der vorliegenden Untersuchung fand sich eine signifikante Zunahme des PADA-AI im höheren Lebensalter, auch unabhängig von andern Einflüssen wie Grunderkrankung und Thrombozytenzahl.

Über den PADA Test liegen erst wenige publizierte Arbeiten (Schumann A. et al. 2004, Nowak G. et al. 2005, Schumann A. et al. 2005, Sick P. et al. 2005, Warnholtz A. et al. 2005) vor. Die Arbeitsgruppe um Nowak (Schumann A. et al. 2004, Nowak G. 2005) fand bei 220 gesunden Probanden lediglich eine tendenzielle Zunahme des PADA-AI mit höherem Lebensalter. In dieser Arbeit wurden die Alterswerte zwar nicht detailliert benannt, sie lassen sich jedoch aus einer Abbildung (Nowak G. 2005: Figure 4 . influence of age on the adhesionindex%) ableiten. Die Zahl der über 60-jährigen war demnach sehr gering. Bei einer entsprechenden Analyse der Korrelation zwischen PADA-AI und Alter bei Patienten unserer Studie unter Ausschluss der über 60-jährigen (n = 99) fand sich ebenfalls keine signifikante Korrelation (Korrelation nach Pearson 0,041 bei einem p-Wert von 0,69; Einzelergebnis, im Ergebnisteil nicht explizit dargestellt). Somit erklärt sich die scheinbare Diskrepanz hinsichtlich der Altersabhängigkeit des PADA-AI zwischen den Daten von Nowak et al. und denen der vorliegenden Studie aus der unterschiedlichen Altersstruktur der Untersuchungskollektive. Der signifikante Alterseffekt lässt sich folglich nur dann nachweisen, wenn eine hinreichende Zahl von Patienten im höheren Lebensalter (>60) in die Untersuchung eingeschlossen werden.

Der Einfluss des Alters, auf den PADA-AI, wie er in der vorliegenden Studie gezeigt wurde, wird in zukünftigen Untersuchungen mit dem PADA-Test zu berücksichtigen sein und auf Reproduzierbarkeit in einer größeren Kontrollgruppe (in der vorliegenden Studie $n = 89$) überprüft werden müssen. Da der PADA-AI als Maß des Aktivitätszustandes des GPIIb/IIIa-Rezeptors angenommen werden kann (Nowak G. et al. 2005), erscheinen Vergleiche mit anderen Studien zur Frage der Altersabhängigkeit der Thrombozytenaktivierung sinnvoll. Es finden sich in der Literatur nur wenige Arbeiten, in denen auf den Zusammenhang zwischen Alter und Thrombozytenaktivierungsmarkern eingegangen wird. Diese Arbeiten sind auf Grund der unterschiedlichen Methoden und geringen Patientenzahlen zudem nur eingeschränkt miteinander in Bezug zu setzen.

So fand sich kein Zusammenhang zwischen Alter und Expression von CD62p (Freisetzungsmarker für p-Selektin) in einer Studie an Patienten mit Vorhofflimmern (Hon-Kann Y. et al. 2006). In einer weiteren Studie über Thrombozytenaktivierung bei Patienten mit Vorhofflimmern fand sich ebenfalls keine Korrelation zwischen CD62p und Alter, jedoch zwischen Alter und vWF ($p < 0,001$) als Marker für einen Endothelschaden oder eine endotheliale Dysfunktion (Dwayne SG. et al. 2002). Im Gegensatz dazu fanden Cherman et al. in einer Untersuchung an 200 Patienten mit akuter zerebraler Ischämie und 205 in Alter und Geschlecht angepassten Probanden weder eine Korrelation zwischen Alter und CD62p, noch zwischen Alter und vWF (Cherman P. et al. 2003). Eine Abnahme der ADP-induzierten Aggregation in höherem Lebensalter konnte in einer Studie von Gilstad et al. an 55 Patienten mit akutem Koronarsyndrom und 54 Personen mit stabiler Angina pectoris festgestellt werden (Gilstad JR. et al. 2008). Zusammenfassend zeigen die bisher veröffentlichten Ergebnisse keinen Zusammenhang zwischen Alter und CD 62p-Aktivität und widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf die Aktivität des vWF.

In der vorliegenden Studie konnte erstmals der Nachweis geführt werden, dass das Lebensalter einen Einfluss auf die mit dem PADA-Test erfasste Thrombozytenadhäsivität hat. Da die Aktivierung von Thrombozyten in mehreren Schritten erfolgt (siehe 2.2.) und die Freisetzungsreaktion von CD62p erst im Verlauf erfolgt, kann die Altersabhängigkeit des PADA-AI Ausdruck eines bisher nicht evidenten Alterseffektes sein, zum Beispiel als Folge der

Gefäßwandalterung und einer damit verursachten Thrombozytenaktivierung ohne unmittelbare Freisetzungsreaktion.

Der Thrombozytenadhäsivität bei akuten zerebralen Ischämien (und auch anderen kardiovaskulären Erkrankungen) kommt im höheren Lebensalter möglicherweise eine besondere Bedeutung zu, der künftig vermehrt Aufmerksamkeit gewidmet werden sollte.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis der vorliegenden Untersuchung ist die Abhängigkeit des PADA-AI von der Thrombozytenzahl. Hier kommt es auch unter Berücksichtigung der Einflüsse des Alters zu einer Zunahme des PADA-AI bei Abnahme der Thrombozytenzahl.

In den bisher veröffentlichten klinischen Studien zum PADA-Test wurde die Korrelation zwischen Thrombozytenzahl und PADA-AI nicht untersucht. Bei der Entwicklung des PADA-Test (Nowak G. et al. 2005) wurde zu dieser Fragestellung eine gesonderte Untersuchung durchgeführt. Dazu wurde durch Zentrifugation thrombozytenfreies Plasma hergestellt und diesem eine definierte Menge Thrombozyten hinzugegeben und jeweils der PADA-AI bestimmt. In dieser Versuchsanordnung fand sich kein Zusammenhang zwischen Thrombozytenzahl und PADA-AI. Die vorliegende Studie kommt methodisch in vivo Bedingungen deutlich näher. Somit kann vermutet werden, dass nachgewiesene signifikante Korrelation zwischen niedrigerer Thrombozytenzahl und erhöhtem PADA-AI Ausdruck eines bisher nicht bekannten Zusammenhanges ist, der aus methodischen Gründen zuvor nicht erkannt wurde.

Darüber hinaus zeigt die vorliegende Untersuchung eine Abnahme der Thrombozytenzahl im höheren Lebensalter (im Ergebnissteil nicht separat dargestellt: negative Korrelation nach Pearson - 0,161, Signifikanz $p = 0,006$ und Trend zu erniedrigter Thrombozytenzahl bei akuter zerebraler Ischämie im Vergleich zur Kontrollgruppe $p = 0,065$). Ein möglicher Erklärungsansatz dafür ist ein erhöhter Verbrauch von Thrombozyten, die durch altersabhängige kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie zum Beispiel Arteriosklerose, aktiviert werden. Durch einen solchen Mechanismus könnte auch die Zunahme des PADA-AI im höheren Lebensalter und bei kardiovaskulären Risikofaktoren wie KHK, Hypertonie, extra- und intrakranieller Stenose der hirnversorgenden

Gefäße erklärt werden, die wir in der vorliegenden Untersuchung nachweisen konnten.

In der Literatur finden sich zum Zusammenhang zwischen Thrombozytenzahl und kardiovaskulären Risikofaktoren unterschiedliche Aussagen.

McCabe et al. fanden eine erhöhte Thrombozytenzahl bei Patienten mit einer symptomatischen Stenose der Arteria carotis interna im Vergleich mit einer asymptomatischen Carotisstenose bei allerdings sehr kleinem Patientenkollektiv (Gruppengröße $n = 16$) (McCabe DJ. Et al. 2005). Valkila et al. fanden in einer Untersuchung an 160 Patienten eine signifikant ($p < 0,05$) erhöhte Thrombozytenzahl bei Patienten, die eine akute zerebrale Ischämie in Folge einer symptomatischen ACI Stenose erlitten hatten im Vergleich zu Patienten mit TIA und einer Kontrollgruppe (Valkila EH. et al. 1994).

Auch im ~~s~~West Birmingham Stroke Projekt fand sich bei einer Untersuchung an 59 hypertensiven Patienten mit akuter zerebraler Ischämie ebenfalls eine signifikant erhöhte Thrombozytenzahl ($p < 0,001$) im Vergleich zu gesunden und hypertensiven Kontrollen (Nadar S. et al. 2004).

Keinen Unterschied in der Thrombozytenzahl fanden Fusegawa et al. in einer Untersuchung, die die Thrombozytenzahl (und andere Thrombozytenmarker) bei 63 hypertonen Patienten mit einer plaquebildenden Makroangiopathie der Arteria carotis interna mit 62 alterskorrelierten hypertonen Patienten ohne Plaques in der Arteria carotis interna verglichen (Fusegawa Y. et al. 2006).

Hinweise auf einen Thrombozytenverbrauch bei instabiler Angina pectoris fanden Pizzuli L. et al. in einer größeren Untersuchung zur Thrombozytenzahl bei 981 Patienten mit stabiler und instabiler Angina pectoris. Sie fanden eine signifikant niedrigere Thrombozytenzahl bei instabiler Angina pectoris, was sie als Hinweis auf eine gesteigerte Thrombozytendestruktion werteten (Pizzuli L. et al. 1998).

Die Frage, ob kardiovaskuläre Erkrankungen mit einem Thrombozytenverbrauch bei gleichzeitig vermehrter Thrombozytenaktivierung einhergehen und welcher pathophysiologische Mechanismus möglicherweise dazu beiträgt, lässt sich auf Grund der unterschiedlichen Ergebnisse noch nicht abschließend beantworten und sollte Gegenstand zukünftiger wissenschaftlicher Untersuchungen sein.

6.2. PADA-AI bei akuter zerebraler Ischämie

Die klinische Bedeutung des PADA -Testes bei Patienten mit einer akuten zerebralen Ischämie und einer TIA wurde bisher nicht untersucht. Der Normalbereich des PADA-Testes wird vom Hersteller mit einem PADA-AI von 30 - 70 angegeben, Mittelwert 50 (Schumann A. et al. 2005). In den bisher veröffentlichten kardiologischen Studien mit dem PADA-Test konnte dieser Normbereich bestätigt werden. So fand sich bei 43 gesunden Probanden (ohne Altersangabe) ein durchschnittlicher PADA-AI von $56 \pm 3,7$ (Ostad A. 2004). In einer Arbeit von Goldmann et al. variierte der PADA-AI bei 50 gesunden Probanden zwischen 40 und 60 (Goldmann B. et al. 2007). In der vorliegenden Untersuchung betrug der durchschnittliche PADA-AI in der Kontrollgruppe 55,1.

In der vorliegenden Untersuchung waren Patienten mit einer Sinusvenenthrombose mit einem mittleren PADA-AI von 72,2 die einzige Patientengruppe mit einem durchschnittlichen PADA-AI außerhalb des Normbereiches. Die pathologische Erhöhung des PADA-AI ließ sich hier bei 2 von 3 Patienten nachweisen. Als Ursache hierfür ist die Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors durch das im Rahmen der akuten Thrombose freigesetzte Thrombin anzunehmen (siehe 2.2.).

Eine Beeinflussung des PADA-AI durch die zur stationären Einweisung führende Erkrankung fand sich in der statistischen Analyse über alle Erkrankungsgruppen unter Berücksichtigung der Einflüsse von Alter und Thrombozytenzahl auf den PADA-AI nicht. Da es sich bei den Patientengruppen „Sinusvenenthrombose“, „Vaskulitis“ und „intrazerebrale Blutung“ um Patienten mit Erkrankungen handelt, die nicht mit einer für die akute zerebrale Ischämie typischen Pathophysiologie einhergehen und diese Patientengruppen zudem sehr klein waren, wurden sie aus der weiteren statistischen Analyse ausgenommen.

Unter dieser Kautelle fand sich in der vorliegenden Untersuchung auch unter Berücksichtigung der Einflüsse von Alter und Thrombozytenzahl ein signifikant erhöhter PADA-AI bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie im Vergleich zur Kontrollgruppe und Patienten mit einer TIA.

Dieses Ergebnis zeigt, dass der PADA-Test geeignet ist, die mit anderen Untersuchungsverfahren (siehe unten) nachgewiesene Thrombozytenaktivierung nach akuter zerebraler Ischämie nachzuweisen.

Da der PADA-Test bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie bisher nicht untersucht wurde, können nur die bisher veröffentlichten kardiologischen Studien zu Vergleichszwecken in Bezug auf eine Wertung krankheitsbedingter Einflüsse auf den PADA-AI herangezogen werden.

So fanden Ostad (Dissertation Ostad A. 2004), Burkhardt et al. (Poster; Burkhardt T. et al. 2007) und Sick P. et al. (Poster; Sick P. et al. 2004) bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom ebenfalls signifikant erhöhte PADA-AI: Ostad A. 10 Patienten: AI 77,0 +/- 5,5 % Kontrolle 56,0 +/- 3,7 %; Sick P. 69 Patienten: AI 64,0, keine Angaben zur Kontrollgruppe; Burkhardt T.: 116 Patienten: AI 67,1 +/- 14,2 %, Kontrolle AI 40-60. Als Ursache wird eine vermehrte Thrombozytenaktivierung durch die akute kardiale Ischämie angenommen, wobei in den Präsentationen (Poster, Abstract eines Vortrages) nicht genauer auf den vermuteten Pathomechanismus eingegangen wird.

Einschränkend muss zu den oben genannten kardiologischen Studien gesagt werden, dass in ihnen die in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesenen Einflussfaktoren Alter und Thrombozytenzahl nicht berücksichtigt wurden.

Dass bei kardiologischen Patienten weitere Untersuchungen über die Beeinflussung des PADA-AI durch Erkrankungen und diagnostische Maßnahmen notwendig sind, ergibt sich aus den unterschiedlichen Ergebnissen über die Änderung des PADA-AI nach Koronarintervention. So fanden Sick et.al. bei 69 untersuchten Patienten eine signifikante Zunahme des durchschnittlichen PADA-AI nach Koronarintervention von 64,0 auf 70,5 (Poster, Sick P. 2004), während es in der Studie von Warnholtz et al. bei 25 Patienten zwar ebenfalls zu einer Zunahme des PADA-AI, jedoch nicht zu einer signifikanten Änderung kam (vorher 53 +/- 6 %, nachher 57 +/- 5 %) (Abstract Vortrag, Warnholtz A. 2004), möglicherweise auf Grund des relativ kleinen Untersuchungskollektives.

Es finden sich in der Literatur nur wenige Arbeiten, die den Einfluss einer akuten zerebralen Ischämie auf den für den PADA-Test bedeutsamen GPIIb/IIIa-Rezeptor untersucht haben.

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse mit dem PADA-Test und denen anderer Arbeiten ist durch die unterschiedliche Methodik nicht möglich.

Unter Berücksichtigung dieser Einschränkung, steht das Ergebnis der vorliegenden Untersuchung im Widerspruch zu den Befunden Serebruany et al., die in einer Untersuchung an 120 Patienten (aufgeteilt in 3 Gruppen: akute zerebrale Ischämie ohne ASS, Patienten mit zurückliegender akuter zerebraler Ischämie unter ASS und Patienten mit multiplen Risikofaktoren ohne ASS) keine signifikante Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors CD 41a ($p = 0,14$) nachweisen konnten (Serebruany VL. et al. 2004). Im Gegensatz dazu fanden Fateh-Moghadam et al. in einer Untersuchung an 64 Patienten mit akuter zerebraler Ischämie eine vermehrte Aktivität des GPIIb/IIIa-Rezeptors, bestimmt über einen PAC-1-Rezeptor-Antikörper im Vergleich zu einer Gruppe von 74 Patienten mit einer TIA (Fateh-Moghadam S. et al. 2007).

Weitere Studien untersuchten die Thrombozytenaktivierung über die Messung von CD62p. Ein direkter Vergleich mit dem PADA-Test ist hier nicht möglich, da die Freisetzung von CD62p erst nach einer Aktivierung der Thrombozyten erfolgt, während die mit dem PADA-Test messbare Adhäsion nicht zwingend eine Aktivierung voraussetzt (siehe 2.2.). So konnten Grau et al. in einer Studie an 24 Patienten mit einer akuten zerebralen Ischämie im Vergleich zu Patienten mit zurückliegender akuter zerebraler Ischämie und Probanden ohne akute zerebrale Ischämie eine signifikante Zunahme von CD62p (gemessen mit Flow Cytometrie) unmittelbar nach der akuten zerebralen Ischämie nachweisen (Grau A. et al. 1998).

Im West Birmingham Stroke Projekt, einer Untersuchung an 59 Patienten mit akuter zerebraler Ischämie und Hypertonie, fand sich eine signifikante ($p < 0,001$) Erhöhung von CD62p verglichen mit Patienten ohne akute zerebrale Ischämie und Hypertonie (Nadar S. et al. 2004). In einer Studie an 135 Patienten mit akuter zerebraler Ischämie und TIA, verglichen mit 40 gesunden Probanden (die jedoch signifikant jünger waren), untersuchten Htun et al. die Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten mittels FACS-Analyse unmittelbar nach stationärer Aufnahme und im Verlauf. Auch sie fanden eine signifikante Erhöhung der Werte für eine Aktivierung der Thrombozyten gemessen über CD62p ($p < 0,05$) und eine Aktivierung der Thrombozyten-

Leukozyten-Interaktion gemessen anhand von CD42 ($p < 0,001$) und CD11b und CD 14.

In einer Verlaufskontrolle nach 3 Monaten waren bei den Patienten mit akuter zerebraler Ischämie und TIA die Werte für CD62p und CD42 nicht mehr signifikant unterschiedlich von der Kontrollgruppe und im Vergleich zu den Werten unmittelbar nach dem Akutereignis signifikant erniedrigt (Htun P. et al. 2006). Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen fanden Serebruany et al. in der oben genannten Studie keinen Hinweis auf eine Thrombozytenaktivierung nach akuter zerebraler Ischämie unter Verwendung von multiplen Testverfahren einschließlich CD62p (Serebruany VL. et al. 2004).

Zusammenfassend erscheint die Annahme gerechtfertigt, dass eine akute zerebrale Ischämie zu einer Erhöhung der Expression des Markers CD62p führen kann, was als Hinweis auf eine ischämiebedingte Thrombozytenaktivierung mit dadurch verursachter Freisetzung von CD62p zu werten ist. Durch die fehlende Bestimmung der oben genannten Marker unmittelbar vor der Ischämie kann jedoch keine Aussage getroffen werden, ob diese Aktivierung Ursache oder Folge der Ischämie ist.

Unter Berücksichtigung der oben angeführten Studien kann die in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesene Erhöhung des P-Selectin nach akuter zerebraler Ischämie als möglicher Ausdruck einer stattgehabten Thrombozytenaktivierung interpretiert werden. Als Ursache kommen Veränderungen an der Gefäßwand in Folge der Ischämie, eine lokale Thrombusbildung oder auch lokal entzündliche Prozesse in Folge der Ischämie in Betracht. Dass die Thrombozytenaktivierung eine akute Folge der Ischämie sein könnte, legt die in der o. g. Untersuchung von Htun et al. nachgewiesene Normalisierung des CD62p im Verlauf von Monaten nach akuter zerebraler Ischämie nahe.

Alternativ könnte jedoch auch eine vorbestehende Thrombozytenaktivierung, zum Beispiel durch arteriosklerotische Gefäßwandveränderungen für die Erhöhung des P-Selectin bei akuter zerebraler Ischämie verantwortlich sein. Auch der Nachweis einer Tendenz zu einem erhöhten P-Selectin in der Gruppe von Patienten mit zurückliegender zerebraler Ischämie in der vorliegenden Studie könnte für eine längere Zeit nach Akutereignis nachweisbare vermehrte Thrombozytenaktivierung sprechen, zum Beispiel in Folge einer Arteriosklerose.

Zur Klärung dieser Frage sind weitere Untersuchungen, zum Beispiel auch am Tiermodell mit experimentellem Hirninfarkt mit Messung der Thrombozytenaktivierung unmittelbar vor und nach der Ischämie und prospektiv in Risikogruppen notwendig.

6.3. PADA-AI und transiente ischämische Attacke

Im Gegensatz zu Patienten mit akuter zerebraler Ischämie fand sich in der vorliegenden Untersuchung bei Patienten mit einer TIA kein erhöhter PADA-AI und kein Unterschied zur Kontrollgruppe. Aussagen zur Beeinflussung des PADA-AI durch eine TIA finden sich in der Literatur nicht, so dass zur Interpretation dieses Ergebnisses ein Vergleich mit Studien notwendig ist, die die Frage einer Thrombozytenaktivierung mit anderen Verfahren untersuchten. So fanden Tatli et al. in einer Untersuchung mit einer sPlatelet aggregation ratio% an 45 Patienten mit akuter zerebraler Ischämie (nicht kardialer Genese) und 30 Patienten mit TIA (nicht kardialer Genese) sowie 25 gesunden Kontrollpersonen eine signifikant erhöhte Thrombozytenaggregation in der Patientengruppe mit akuter zerebraler Ischämie im Vergleich zu Patienten mit TIA, allerdings auch zwischen Patienten mit TIA und einer gesunden Kontrollgruppe (Tatli M. et al. 2006). Auch Fateh-Moghadam et al. fanden in einer Untersuchung an 74 Patienten mit akuter zerebraler Ischämie und 64 Patienten mit TIA eine signifikant (ADP $p = 0,002$, Arachnidonsäure $p = 0,047$) erhöhte Thrombozytenaggregation nach Agonistenstimulation bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie im Vergleich zur TIA (ohne gesunde Kontrollgruppe). Im Widerspruch dazu steht der fehlende Unterschied in Bezug auf Thrombozytenaktivierungsmarker (CD62p, CD63, PAC-1) (Fateh-Moghadam S. et al. 2007), wie er auch in der Untersuchung von Htun P et al. (siehe oben) nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend findet sich in der Literatur somit der Hinweis auf eine im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erhöhte Thrombozytenaktivierung bei TIA. Andererseits jedoch auch ein Unterschied im Verhalten der Thrombozyten in der Aggregometrie zwischen TIA und akuter zerebraler Ischämie. Das Ergebnis der vorliegenden Untersuchung steht somit in einem möglichen Widerspruch zu den Ergebnissen der oben genannten Untersuchungen.

Insbesondere unter Berücksichtigung dessen, dass die mit dem PADA-Test erfasste Änderung der Thrombozytenadhäsivität schon vor einer Änderung der Aggregation und Freisetzungsreaktion auftreten müsste. Allerdings ist ein direkter Vergleich der verwendeten Methoden nicht möglich.

Eine mögliche Erklärung einer geringeren Thrombozytenaktivierung ist der pathophysiologisch anzunehmende geringere Endothelschaden bei einer TIA, so dass es bei dieser zu einer geringeren lokalen Thrombozytenaktivierung als nach manifester Infarzierung kommt. Dafür könnten auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie sprechen, die bei der Analyse der Einflüsse des zerebralen Korrelates in der ZNS-Bildgebung einen signifikant erhöhten PADA-AI nach kortikalem und subkortikalem Infarkt im Vergleich zu lakunären Infarkten und der Kontrollgruppe zeigte. Diese Annahme kann jedoch die in den oben genannten Untersuchungen nachgewiesene Aktivierung (CD62p; CD63) als Ausdruck einer stattgehabten Freisetzungsreaktion nicht erklären.

Andererseits wiesen die Patienten mit TIA in der vorliegenden Untersuchung ein im Vergleich zu den Patienten mit akuter zerebraler Ischämie signifikant geringeres Rezidivrisiko (erfasst mit dem Essener Stroke Rezidiv Score) für erneute zerebrale Ischämien auf. Somit könnte der im Vergleich zur Patientengruppe mit akuter zerebraler Ischämie niedrigere PADA-AI auch Folge einer vorbestehend geringeren Thrombozytenaktivierung sein.

Folgt man dieser Argumentation, so könnten im Umkehrschluss Patienten mit einem höheren PADA-AI möglicherweise primär auch ein erhöhtes Risiko tragen, eine komplette zerebrale Ischämie zu erleiden. Dies würde die vorliegende Diskrepanz der Ergebnisse zwischen den beiden Ischämietypen erklären. Als denkbarer Pathomechanismus käme bei der akuten zerebralen Ischämie die Anlagerung von bereits vorab aktivierten Thrombozyten an den lokalen Thrombus mit Vergrößerung des Thrombusvolumens und die vermehrte Interaktion mit dem Endothel und Leukozyten in Frage. Dies könnte eine vermehrte Emboliegenität des Thrombus, eine ausgeprägtere Thrombusbildung und eine Zunahme der lokalen Gewebeschädigung auslösen.

6.4. PADA-AI in ätiologischen und bildmorphologischen Subgruppen nach akuter zerebraler Ischämie

In der vorliegenden Untersuchung fand sich unter Berücksichtigung der Einflüsse von Alter und Thrombozytenzahl auf den PADA-AI kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Ätiologie der akuten zerebralen Ischämie eingeteilt nach TOAST Kriterien und Höhe des PADA-AI.

Allerdings zeichnete sich ein deutlicher Trend zu einem erhöhten PADA-AI bei akuter zerebraler Ischämie in den ätiologischen Gruppen sTOAST 1‰ (Arteriosklerose mit > 50 % Stenose der verantwortlichen hirnersorgenden Arterie) und sTOAST 5‰ (akute zerebrale Ischämie bei konkurrierenden Ursachen / ungeklärter Ätiologie, in der besonders Patienten mit einer plaquebildenden Makroangiopathie der hirnersorgenden GefäÙe erfasst werden) im Vergleich zu mikrovaskulären Hirninfarkten ab, was tendenziell für eine vermehrte Thrombozytenaktivierung in diesen Patientengruppen spricht. Es findet sich in der Literatur keine Studie, die diese Fragestellung in Bezug auf die Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors und / oder des PADA-AI in Abhängigkeit von der Ätiologie einer akuten zerebralen Ischämie untersucht. Zur Wertung der Ergebnisse können daher nur Vergleiche mit anderen Messverfahren der Thrombozyten- und / oder Endothelaktivierung herangezogen werden.

Zwei Studien untersuchten Unterschiede in der Thrombozytenaktivierung bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie in Abhängigkeit von der Ätiologie nach TOAST-Kriterien. So fanden Zeller et al bei einer Untersuchung an 72 Patienten mit akuter zerebraler Ischämie verglichen mit 72 gesunden Probanden eine Erhöhung von CD62p bei Patienten mit einer akuten zerebralen Ischämie in Folge einer Arteriosklerose mit > 50 % Stenose des verantwortlichen hirnersorgenden GefäÙes (TOAST 1), nicht jedoch bei Patienten mit einer Ischämie kardial-embolischen Genese (TOAST 2) (Zeller JA. et al. 1999). In einer Untersuchung an 200 Patienten mit akuter zerebraler Ischämie im Vergleich zu einer im Alter und Geschlecht angepassten Kontrollgruppe fanden Chrerian et al. mit einer ELISA-Technik bei allen Patienten unabhängig von der Ätiologie ein im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,001$) erhöhten Titer für E-Selektin (Endothel-Aktivierungsmarker), der bei Patienten mit einer Atherothrombose mit > 50 % Stenose der hirnersorgenden GefäÙe als

Ursache der akuten zerebralen Ischämie am stärksten erhöht war. Nur in der Gruppe der Patienten mit Atherothrombose und > 50 % Stenose (TOAST 1) war in dieser Studie der Wert für den vWF signifikant ($p = 0,003$) erhöht, während bei Patienten mit kardial-embolischer Genese der akuten zerebralen Ischämie oder lakunärer Genese der akuten zerebralen Ischämie sich dieser Wert nicht signifikant von der Kontrollgruppe unterschied. In dieser Untersuchung konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie die Zahl von Thrombozyten-Mikropartikeln unmittelbar nach der akuten zerebralen Ischämie und auch im Verlauf von 3 Monaten signifikant erhöht ist (Cherian P. et al. 2003).

Zusammenfassend sprechen diese beiden Studien und die vorliegende Untersuchung für eine unterschiedliche Aktivierung von Thrombozyten in Abhängigkeit von der Ätiologie der akuten zerebralen Ischämie nach TOAST Kriterien. Übereinstimmend sprechen die Arbeiten für eine vermehrte Thrombozytenaktivierung bei arteriosklerotisch verursachten Hirninfarkten. In der vorliegenden Studie ließ sich unter Verwendung des PADA -Tests auch unter Berücksichtigung der Einflüsse von Thrombozytenzahl und Alter ein signifikant erhöhter PADA-AI bei kortikalen und subkortikalen Infarkten im Vergleich zur Kontrollgruppe und mikrovaskulären / lakunären Infarkten nachweisen. Dieser Befund spricht dafür, dass es bei einer ischämisch bedingten ausgedehnten Schädigung des Endothels und Hirnparenchyms zu einer mit dem PADA-Test erfassbaren Aktivierung des GP IIb/IIIa-Rezeptors kommt. Grundlage hierfür könnten die lokalen Prozesse nach Ischämie sein, wie sie in der Einleitung (siehe Abschnitt 2.2. ab Seite 11) erläutert wurden. Auch die signifikant höheren PADA-AI bei Patienten mit einer klinischen Verschlechterung des neurologischen Befundes ohne neue Ischämie anderer Lokalisation (progressive stroke) im Vergleich zu Patienten mit akuter zerebraler Ischämie ohne progressive stroke und der Kontrollgruppe wären mit dieser Annahme vereinbar. Weitere Untersuchungen mit dem PADA-Test oder anderen Verfahren zur Thrombozytenaktivierung bei einem progressive stroke liegen bisher nicht vor, so dass ein Vergleich mit anderen Arbeiten nicht möglich ist.

6.5. Einflüsse einer neu begonnenen Sekundärprophylaxe mit Acetylsalizylsäure (ASS), Acetylsalicylsäure + retardiertes Dipyridamol (Í Aggrenoxí) , unfraktioniertem i.v. Heparin (UFH) und Phenprocoumon (PHEN) auf den PADA-AI

Im dritten Teil der vorliegenden Studie wurde der Einfluss einer neu begonnenen Sekundärprophylaxe bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie und TIA auf den PADA-AI untersucht. Schumann et al. konnten eine dosisabhängige Änderung des PADA-AI unter einer Medikation mit Clopidogrel und GPIIb/IIIa Rezeptor Antagonisten (Tirofiban, Abciximab und Eptifibatide) darstellen und in einer Vergleichsuntersuchung, die mit Hilfe einer FACS-Analyse die GPIIb/IIIa Blockade durch Abciximab untersuchte, die gute Korrelation der Ergebnisse zwischen beiden Verfahren nachweisen (Schumann A. et al. 2005). Somit erschien der PADA-Test geeignet, medikamentöse Einflüsse auf den GPIIb/IIIa-Rezeptor nachzuweisen.

In der vorliegenden Studie fand sich bei 22 Patienten kein Einfluss von 100 mg ASS/d auf den PADA-AI. Dieser Befund bestätigt die Untersuchung über den fehlenden Einfluss von ASS auf den PADA-AI in einer Studie an 5 Probanden, in der sich keine Änderung des PADA-AI nach einmaliger Gabe von 500 mg ASS fand (Graff J. et al. 2005). Über die Wirkung von ASS auf die Thrombozytenaktivierung finden sich in der Literatur unterschiedliche Aussagen. Zwar gehen die meisten Autoren davon aus, dass der Effekt von ASS in der Sekundärprophylaxe über die irreversible Blockade der COX-1 von Thromboxan 2 hinausgeht (Marcus E. et al 2003; Goto S. et al 2004; Graeme J. et al. 2006), die genauen Mechanismen sind aber nicht bekannt. In Bezug auf den Einfluss von ASS auf die GPIIb/IIIa-Rezeptor-aktivität findet sich nur eine Arbeit. Marcus et al. untersuchten den Einfluss von ASS ex vivo im Blut von 24 gesunden Probanden und konnten eine signifikante Reduktion von GPIIb/IIIa-Rezeptoren bei hohen Dosen von ASS nachweisen. Als Ursache dafür sehen sie von der COX-1 unabhängige Effekte an, wie zum Beispiel einen Einfluss von ASS auf die Tyrosin abhängige Proteinphosphorylierung und den davon abhängigen Mechanismus der inside-out Regulation bei der Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors (Marcus E. et al. 2003). Diese Arbeit ist jedoch limitiert durch die Gabe von ASS ex vivo und die umgerechnet hohe Dosis von 4 g ASS, um den oben beschriebenen Effekt zu erreichen. Zusammenfassend kann

davon ausgegangen werden, dass ASS in den üblichen Dosierungen (100 . 300 mg/d) keine wesentlichen Wirkungen auf die Aktivierung des GPIIb/III a-Rezeptor haben dürfte, wofür auch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung sprechen. Der PADA-Test eignet sich somit nicht zum sdrug monitoring%einer Sekundärprophylaxe mit ASS.

Nach einer neu begonnenen Sekundärprophylaxe mit sAggrenox%(Kombination von 2 x 25 mg ASS/d mit 2 x 200 mg retardiertem Dipyridamol/d) kam es in der vorliegenden Studie bei 10 Patienten ebenfalls zu keiner signifikanten Änderung des PADA-AI. Aussagen über den möglichen Einfluss von sAggrenox%auf den PADA-AI finden sich in der Literatur bisher nicht.

Im sAGATE-trial%konnte bei Patienten nach akuter zerebraler Ischämie unter der Therapie mit sAggrenox%im Vergleich zu einer Monotherapie mit 81 mg ASS eine signifikante Abnahme der GPIIb/IIIa-Rezeptor Aktivität, gemessen mit dem PAC-1-C-Antikörper ($p = 0,01$), nachgewiesen werden (Serebruany et al. 2004). In weiteren Arbeiten zur potentiellen Wirkung von Dipyridamol auf die Thrombozytenaktivität wird nicht auf die GPIIb/IIIa-Rezeptor Aktivität eingegangen. Sowohl in der vorliegenden Studie als auch im sAGATE-trial%war die untersuchte Patientenzahl gering. Die verwendeten Methoden sind nie vergleichend untersucht worden, so dass über den möglichen Einfluss von Dipyridamol auf die Aktivität des GPIIb/III a-Rezeptors keine abschließende Aussage getroffen werden kann.

Ein Einfluss von einer PTT-gesteuerten intravenösen Behandlung mit unfraktioniertem Heparin (UFH) auf den PADA-AI konnte in der vorliegenden Studie an 24 Patienten nicht nachgewiesen werden. Angaben über den Einfluss von UFH auf den PADA-AI finden sich in der Literatur nicht.

In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen finden sich widersprüchliche Angaben über die Wirkung von unfraktioniertem Heparin auf die Thrombozyten-aktivierung. UFH entfaltet seine Wirkung in der Sekundärprophylaxe über eine Beeinflussung der plasmatischen Gerinnung und führt indirekt zu einer Abnahme von Thrombin, dem stärksten Thrombozytenaktivator (siehe Abschnitt 2.2. Seite 14).

So konnten Pernestorfer et al. in einer Untersuchung an gesunden Probanden eine signifikante ($p = 0,005$) Abnahme des p-Selectin Spiegels nach Gabe von UFH nachweisen, was sie als Folge einer verminderten Thrombozytenaktivierung durch Thrombin interpretierten (Pernestorfer T. et al. 2001). Andererseits fanden mehrere Autoren eine durch UFH ausgelöste Thrombozytenaktivierung, die stärker ist als die Thrombozytenaktivierung nach Gabe von niedermolekularem Heparin. Die genaue Ursache der durch UFH verursachten Thrombozytenaktivierung ist nicht abschließend geklärt, insbesondere nicht bei einer kurzzeitigen Therapie, bei der die immunologischen Effekte wie bei einer Heparin induzierten Thrombozytopenie Typ (HIT) II nicht zu erwarten sind (Xiao Z. et al. 1998, Harding SA. et al. 2006). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass über den Einfluss von UFH auf die Thrombozytenaktivierung und deren klinische Bedeutung unterschiedliche Angaben in der Literatur vorliegen, wobei sich die Einzelergebnisse durch unterschiedliche Methoden nicht miteinander vergleichen lassen.

Ein Einfluss von Phenprocoumon (PHEN) auf den PADA-Test ließ sich bei den zwei, in der vorliegenden Untersuchung, beobachteten Patienten nicht nachweisen. Es kam bei beiden Patienten zu einem leichten, nicht signifikanten Anstieg des PADA-AI im Verlauf. Angaben über den Einfluss von PHEN auf den PADA-Test finden sich in der Literatur nicht.

In anderen Studien, die den Einfluss von PHEN auf die Thrombozytenaktivierung untersuchten, fand sich kein Hinweis auf eine durch PHEN bedingte Abnahme der Thrombozytenaktivierung, sondern ebenfalls eher ein Trend zur Zunahme (Gawaz M. 1996; May AE. et al. 1997).

6.6. Einflüsse einer neu begonnen Sekundärprophylaxe mit Clopidogrel auf den PADA-AI

Clopidogrel entfaltet seine Wirkung am Thrombozyten über einen hepatisch (Cytochrom P450. 1A abhängig) gebildeten aktiven Metaboliten, sclopidogrel carboxylic acid%(Mani H. et al. 2008). Dieser führt zu einer externen Blockade des Thrombozyten P2Y₁₂-ADP Rezeptors (Savi P. et al. 1994).

Dieser P2Y₁₂-ADP Rezeptor ist einer von bisher 3 bekannten ADP-Rezeptoren der Thrombozyten (Daniel JL. 1998) und führt im Vergleich zu den anderen Rezeptoren in der Aggregometrie zu einer geringen Beeinflussung von Aktivierungsvorgängen der Thrombozyten wie sshape change%oder Freisetzungsmechanismen (Jagroop JA. 2003).

Da die klinischen Effekte (Verhinderung von erneuten kardiovaskulären Ereignissen, vaskulärer Tod) von Clopidogrel in den Sekundär prophylaxe-studien nicht mit den Effekten der Rezeptorblockade von P2Y₁₂-ADP nach ADP Stimulation in den in vitro Untersuchungen im erwarteten Umfang korrelierten (Goto S. et al. 2002), wurde nach weiteren Wirkmechanismen des P2Y₁₂-ADP-Rezeptors gesucht. So konnte die Arbeitsgruppe von Goto et.al. nachweisen, dass dieser Rezeptor (P2Y₁₂-ADP) in vitro auch ohne die Anwesenheit von ADP unter Flussbedingungen durch freigelegte subendotheliale Matrix aktiviert werden kann (Goto S. et al. 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation des P2Y₁₂-ADP Rezeptors durch von aktivierten Thrombozyten freigesetztes ADP nicht nur zu einer vermehrten Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung führt, sondern auch zu einer Thrombozytenaktivierung durch Freisetzung von Aktivierungsmarkern wie p-Selektin (CD62p) und vermehrten Bildung von prokoagulatorisch wirkenden Mikropartikeln (Goto S. 2002), die somit durch Clopidogrel gehemmt werden.

In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass es bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie oder TIA nach Einnahme von Clopidogrel zu einer signifikanten Abnahme des durchschnittlichen PADA-AI innerhalb eines Zeitraumes von 5 Tagen kommt. Diese Beobachtung korrespondiert mit den Aussagen von Untersuchungen über eine Reduktion des PADA-AI durch Clopidogrel (Sick P. et al. 2004, Schumann A. et al. 2005). So fanden Sick et.al. in einer Studie an 69 Patienten einen signifikanten Abfall des nach PTCA

angestiegenen PADA-AI nach Gabe von Clopidogrel ($p < 0,001$). Schumann et al. konnten sowohl die Senkung des PADA-AI nach Gabe von Clopidogrel, als auch die geringen Schwankungen des PADA -AI unter einer Langzeittherapie mit Clopidogrel bei einzelnen Patienten beschreiben (Schuman A. et al. 2005).

In der Studie von Savcic M. et al. konnte an gesunden Probanden der Beginn der Wirkung einer Clopidogrel Medikation von 75 mg/d nach 12 - 24 h und die maximale Wirkung nach 3 - 7 Tagen nachwiesen werden (Savcic M. et al. 1999).

Die in der vorliegenden Studie nachgewiesene signifikante Abnahme des PADA-AI im Verlauf von durchschnittlich 5 Tagen nach einer neu begonnenen Sekundärprophylaxe mit Clopidogrel entspricht somit der Erwartung.

Ein signifikanter Unterschied im Ansprechen auf Clopidogrel zwischen Patienten mit und ohne loading dose von 300 mg Clopidogrel ließ sich bei einer Kontrolle des PADA-AI nach durchschnittlich 5 Tagen in der vorliegenden Studie nicht nachweisen. Auch dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da sich der Effekt der loading dose in einer Studie von Grubel et al. nur in den ersten Stunden bis zu 2 Tagen nachweisen ließ und sich die Änderung der Clopidogrel-Effekte bei Patienten mit und ohne loading dose im weiteren Verlauf nicht unterschieden (Grubel P. et al. 2003).

In der vorliegenden Studie fand sich bei verlängerter Beobachtungszeit keine weitere Änderung des PADA-AI im Verlauf.

Auffällig dagegen waren große interindividuelle Unterschiede in der Höhe der Änderung des PADA-AI nach neu begonnener Sekundärprophylaxe mit Clopidogrel. In den bisher veröffentlichten Studien zum Einfluss von Clopidogrel auf den PADA-AI wurde auf diesen Aspekt nicht explizit eingegangen.

Größere interindividuelle Unterschiede im Ansprechen auf eine Medikation mit Clopidogrel wurden bereits mit anderen Verfahren zur Bestimmung der Thrombozytenfunktion (Angiolillo DJ. et al. 2005, Angiolillo DJ. et al. 2004, Cassar K. et al. 2006, Serebruany VL. et al. 2007) nachgewiesen.

Die vorliegende Studie untersuchte erstmalig mögliche Einflussfaktoren, die zu einer unterschiedlichen Änderung des PADA-AI nach neu begonnener Sekundärprophylaxe führen.

So fand sich zwischen Lebensalter und Änderung des PADA -AI eine signifikante negative Korrelation (Korrelation nach Pearson -0,347, $p = 0,01$), ebenso zwischen der Höhe des sEssener Stroke Rezidiv Score%und dem PADA-AI eine negative Korrelation (Korrelation nach Pearson -0,358, $p = 0,008$) sowie eine positive Korrelation zwischen Höhe des PADA-AI vor Beginn der Medikation und der Änderung des PADA-AI (Korrelation nach Pearson 0,554, $p = 0,000$). So haben in der vorliegenden Untersuchung jüngere Patienten mit geringen kardiovaskulären Risikofaktoren und initial erhöhtem PADA Wert die größte Reduktion des PADA-AI nach Einleitung einer Sekundärprophylaxe mit Clopidogrel.

In der Literatur finden sich keine Angaben über einen Zusammenhang zwischen Alter, kardiovaskulären Risikofaktoren, Höhe des PADA-AI und der interindividuell unterschiedlichen Änderung des PADA-AI nach Gabe von Clopidogrel, so dass im Weiteren Vergleiche mit anderen Untersuchungsverfahren der Thrombozytenfunktion herangezogen werden.

In einer Untersuchung von Prabhakaran et al. fand sich eine Abhängigkeit der Wirkung von Clopidogrel vom Alter und dem Vorliegen von Diabetes mellitus. Korrespondierend zu unseren Ergebnissen konnten sie in einer Studie an 76 Patienten zeigen, dass höheres Lebensalter und Vorliegen von Diabetes mellitus mit einer signifikant schwächeren Thrombozyteninhibition (gemessen über ein PSY12-Assay) nach Clopidogrel-Therapie verbunden sind (Prabhakaran S. et al. 2008).

Die Ursache dafür ist unbekannt. Ein theoretisch möglicher Erklärungsansatz könnte ein veränderter Metabolismus von Clopidogrel in Folge von Alterung und / oder anderen Einflüssen (z.B. Begleitmedikation) auf das Cytochrom P450-1A sein. So fanden Mani H. et al. in einer Untersuchung an 52 Patienten eine individuell sehr unterschiedliche Konzentration des Clopidogrel Metaboliten α clopidogrel carboxylic acid%vier Stunden nach Einnahme von 75 mg Clopidogrel (Mani H. et al. 2008) als Hinweis auf einen interindividuell unterschiedlichen Metabolismus.

Die Ergebnisse der Studie Prabhakaran S. et al. konnten in Bezug auf die Effekte des Diabetes mellitus in einer Studie von Serebruany et al. bestätigt werden. In dieser fand sich bei Patienten mit Diabetes mellitus einerseits eine erhöhte Thrombozytenaktivierung vor Einleitung der Therapie [Aggregometrie

nach ADP ($p = 0.0002$) Kollagen ($p = 0.03$) PFA-100 ($p = 0.02$) Expression von PECAM-1 ($p = 0.01$), GP IIb/IIIa-Antigen ($p = 0.001$) und GP IIb/IIIa-Aktivität ($p = 0.02$), Vitronectin-Rezeptor ($p = 0.03$), P-Selectin ($p = 0.02$) PAR-1 Thrombin Rezeptor ($p = 0.02$)] als auch ein vermindertes Ansprechen auf eine neue Clopidogrelmedikation verglichen mit einer Kontrollgruppe ohne Diabetes mellitus. In dieser Studie wird jedoch auch darauf hingewiesen, dass die klinische Bedeutung dieser Ergebnisse noch nicht untersucht ist (Serebruany VL. et al. 2008). Das Ergebnis der vorliegenden Studie, dass ein erhöhtes Rezidivrisiko (wie es im Essener Stroke Rezidiv Score erfasst wird) für Hirninfarkte mit einer geringeren Änderung des PADA-AI einhergeht, könnte ebenfalls in einem sinnvollen Bezug zu den Ergebnissen der Studien zum Diabetes mellitus stehen, da dieser einem Unterpunkt des ESRS entspricht. Untersuchungen zum selektiven Einfluss weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Wirkung von Clopidogrel liegen nicht vor. Das Ergebnis der vorliegenden Studie, dass eine stärkeren Änderung des PADA-AI nach Gabe von Clopidogrel bei höherem PADA-AI vor Beginn der Medikation wahrscheinlicher ist, deckt sich, soweit dieser Vergleich bei unterschiedlichen Methoden möglich ist, mit den Ergebnissen einer Untersuchung von Payne et al, die bei 54 Patienten nachweisen konnten, dass das Ansprechen auf eine Einmalgabe von 75 mg Clopidogrel mit der Höhe der vor Medikation gemessenen ADP induzierten Aggregation korreliert (Payne DA et al. 2007). Im Gegensatz dazu fanden Angiolillo et al. in einer Untersuchung an 48 Patienten eine negative Korrelation zwischen ADP induzierter Aggregation und deren Änderung nach einer Loading dose Clopidogrel von 300 mg (Angiolillo DJ et al. 2005).

Eine weitere mögliche Ursache des unterschiedlichen Ansprechens auf Clopidogrel sind genetische Faktoren. So fanden Angiolillo et al. bei homozygoten Patienten mit dem genetischen Subtyp P1A2/A2 des GPIIb-Rezeptors eine vermehrte Rezeptoraktivierung und ein vermindertes Ansprechen auf eine Loading dose von 300 mg Clopidogrel im Vergleich zu den homozygoten Trägern vom Typ P1A1/A1 und den heterozygoten Trägern P1A1/P1A2 (Angiolillo DJ et al. 2004). Dieser Befund konnte in einer Studie von Lev et al. an 120 Patienten jedoch nicht bestätigt werden.

Sie fanden keinen Zusammenhang zwischen der Wirkung von Clopidogrel und ASS und der genetischen Variabilität des PIA von GP-IIIa, dem T744C Polymorphismus des P2Y₁₂-Rezeptor-Genes und des 1622A-G Polymorphismus des P2Y₁-Genes. Es fand sich lediglich eine Trend ($p = 0,065$) zur Verminderung der Bindung an PAC-1 nach Clopidogrelgabe bei Patienten mit dem genetischen Subtyp PIA₂/A₂. Sie gehen daher davon aus, dass das unterschiedliche Ansprechen auf Clopidogrel multifaktorieller Genese ist und nicht auf eine einzelne Mutation bezogen werden kann (Lev El et al. 2007).

Aktuell wurden erste Daten zum Einfluss von genetischen Faktoren auf den Clopidogrel Stoffwechsel und deren klinische Bedeutung veröffentlicht. So fanden Mega et al. sowohl einen signifikanten ($p < 0,0001$) Zusammenhang zwischen Spiegel des aktiven Metaboliten von Clopidogrel und dem Vorhandensein von bestimmten genetischen Merkmalen (CYP2C19 Allel des CYP P-450 Enzymes, das mit einer verminderten Funktion verbunden ist) bei 162 gesunden Probanden, als auch einen signifikanten Zusammenhang ($p = 0,01$) zwischen Komplikationen (kombinierter Endpunkt Tod durch kardiovaskuläre Ursache, Myokardinfarkt, akute zerebrale Ischämie) und Vorliegen dieser Mutation bei 1477 Patienten nach akutem Koronarsyndrom. Auch das Risiko einer Stent-Thrombose war in der Patientengruppe mit Nachweis dieser Mutation 3-fach erhöht (Mega JL. et al. 2009). Simon et al. konnten dieses Ergebnis in einer Untersuchung an 2208 Patienten mit akutem Myokardinfarkt bestätigen. Sie fanden einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von $\text{sCYP2C19 loss of function alleles}$ und dem Risiko von kardiovaskulären Komplikationen, insbesondere nach Stent (Simon T. et al. 2009).

6.7. Drug monitoring und Clopidogrel-Resistenz

Ein drug monitoring der Wirkung von Clopidogrel (und anderen Thrombozytenfunktionshemmern) kann nur über die Messung von Veränderungen an bestimmten Thrombozytenfunktionsmarkern (wie z.B. dem PADA-Test) oder in Zukunft auch aktiven Metaboliten erfolgen, da der Effekt im Rahmen der Sekundärprophylaxe nur langfristig zu beurteilen ist und ein ischämisches Rezidivereignis auf Grund der vielen beteiligten Faktoren nicht

zwangsläufig Folge eines Versagens der Wirkung des Medikamentes sein muss. Dies wird durch die relativ geringe relative Risikoreduktion in großen Sekundärprophylaxe-Studien unterstrichen.

Ziel des ~~sd~~drug monitorings~~%~~ ist es, frühzeitig Patienten zu identifizieren, die möglicherweise nicht, oder nur vermindert, von einer bestimmten Medikation profitieren oder die ein erhöhtes Blutungsrisiko unter der Sekundärprophylaxe aufweisen. Sollte sich ein solcher Parameter finden lassen, so könnte vor, oder kurz nach Beginn der Sekundärprophylaxe eine gezielte Selektion der Patienten erfolgen, die zu einer Verbesserung der relativen Risikoreduktion, zu einer Verminderung von Blutungskomplikationen und zu einer Reduktion der NNT führt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen die Aussagen früherer Untersuchungen, dass der PADA-Test die Möglichkeit des ~~sd~~drug monitoring~~%~~ von Clopidogrel bietet, da sich nach Beginn der Medikation eine signifikante Änderung des PADA-AI nachweisen ließ, die sich als Folge von medikamentösen Effekten durch Clopidogrel auf den GP IIb/IIIa-Rezeptor erklären lässt, da andere eingesetzte Medikamente (ASS, ~~s~~Aggrenox~~%~~, unfractioniertes Heparin, Phenprocoumon), die diesen Rezeptor nicht beeinflussen, nicht zu einer Änderung des PADA-AI im vergleichbaren Zeiträumen führten. Weiterhin fanden sich interindividuell unterschiedliche Änderungen des PADA-AI im Verlauf nach neu begonnener Sekundär - prophylaxe mit Clopidogrel, wobei es bei 46,3 % nur zu einer geringen (< 10%) Abnahme des PAD A-AI kam. Über die klinische Bedeutung dieser Ergebnisse kann auf Grund der kleinen Patientenzahl und der kurzen Beobachtungsdauer in der vorliegenden Untersuchung keine Aussage getroffen werden.

Es liegt zu dieser Frage unter Nutzung des PADA - Test bisher eine Untersuchung von Goldmann vor, in der gezeigt werden konnte, dass Patienten (n = 17) mit akutem Koronarsyndrom durch eine akute oder subakute Stentthrombose unter Clopidogrel einen signifikant höheren PADA-AI (56,8 +/- 16.1) aufwiesen als Patienten (n = 19) mit akutem Koronarsyndrom unter Clopidogrel ohne Stentthrombose (AI 37,4 +/- 19,6) (Poster, Goldmann B. et al. 2007).

Auch mit anderen Verfahren zur Bestimmung von Thrombozytenfunktionsparametern fand sich in klinischen Studien ein Zusammenhang zwischen Häufigkeit von ischämischen Rezidivereignissen und den Ergebnissen von Thrombozytenfunktionstests.

Als mögliche Verfahren zur Untersuchung der Clopidogrel Wirkung werden in der Literatur die Bestimmung von sVASP-phosphorylation oder ADP induzierte Aggregometrie (Licht-Aggregometrie oder Vollblut-Aggregometrie) vorgeschlagen (Weber AA. et al. 2008). Auf die Probleme beim Vergleich der unterschiedlichen Methoden wurde bereits im Abschnitt 2.4. eingegangen. Überwiegend handelt es sich hierbei um kardiologische Studien mit der Frage um die Häufigkeit von Stent-Thrombosen. Aus neurologischer Sicht findet sich eine Studie an 50 Patienten über das klinische Outcome nach supraaortalem Stent. Müller-Schunk et al. fanden bei 14 (28 %) Patienten unter Clopidogrel unmittelbar vor der Intervention ein, im Vergleich zur untersuchten Kontrollgruppe ohne Clopidogrel, nicht herabgesetztes Ergebnis in einer ADP-stimulierten Impedanz-Aggregometrie als Ausdruck einer fehlenden oder unzureichenden Wirkung von Clopidogrel. Bei 5 Patienten kam es zu thrombembolischen Komplikationen, wobei alle 5 Patienten eine fehlende Änderung Impedanz-Aggregometrie nach Einnahme von Clopidogrel aufwiesen, was als möglicher Hinweis auf eine sClopidogrel Resistenz in dieser Patientengruppe gewertet werden könnte (Müller-Schunk S. et al. 2008).

Aktuell wird in der Literatur über die klinische Bedeutung von einer sClopidogrel-Resistenz diskutiert. Definiert wird die sClopidogrel-Resistenz dabei als ischämisches Rezidivereignis unter einer Sekundärprophylaxe mit Clopidogrel bei einer geringen oder fehlenden Änderung von bestimmten Laborparametern als mögliche Folge einer fehlenden Wirkung von Clopidogrel. Dabei werden in den veröffentlichten Arbeiten unterschiedliche Auffassungen vertreten, ob eine klinisch relevante sClopidogrel-Resistenz existiert und welche Bedeutung in Bezug auf die Wahl des Medikamentes zur Sekundärprophylaxe diese hat. Diese unterschiedlichen Auffassungen ergeben sich aus der fehlenden Vergleichbarkeit der durchgeführten Studien in Folge methodisch unterschiedlichen Verfahren und verwendeten Definition, ab wann von einer sClopidogrel-Resistenz gesprochen werden kann.

Die Arbeitsgruppe von Fitzgerald DJ. et al. vertritt weiterhin die Auffassung, dass es sich bei der Clopidogrel-Resistenz nicht um einen fehlenden Effekt des aktiven Metaboliten am ADP-Rezeptor handelt, sondern dass die Bioverfügbarkeit des aktiven Metaboliten interindividuell unterschiedlich ist (Fitzgerald DJ. 2007) wie es auch in den oben genannten Studien von Simon et al. und Mega et al. bestätigt werden konnte (Simon T. et al. 2009; Mega JL. et al. 2009).

Bei der Beurteilung vom individuellen Ansprechen auf eine Medikation mit Clopidogrel wird zwischen Resistenz und vermindertem Ansprechen unterschieden. Je nach Verfahren werden unterschiedliche Grenzwerte festgelegt (z.B. Aggregometrie: Änderung < 10 % als Resistenz, < 30 % als vermindertes Ansprechen) und die Häufigkeit des Auftretens einer Resistenz wird mit 5 - 25 % angegeben (Geiger J. et al. 2005).

Auf Grund der fehlenden Vergleichsuntersuchungen können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht direkt mit den Angaben aus der Literatur verglichen werden. Wenn man jedoch ähnliche Grenzwerte annimmt wie bei der Aggregometrie, so bestünde bei 46,3 % der Patienten der vorliegenden Untersuchung eine Clopidogrel-Resistenz und bei 37,1 % ein vermindertes Ansprechen. Dieses Ergebnis, eines sehr großen Anteils von Patienten mit fehlender oder geringer Änderung des PADA-AI nach Einnahme von Clopidogrel unterstreicht die Notwendigkeit einer weiteren klinischen Evaluation der interindividuellen Änderung des PADA-AI unter Clopidogrel, bevor Grenzwerte für den PADA-AI in Bezug auf eine zu vermutende Clopidogrel-Resistenz festgelegt werden können.

Christiaens et al. weisen in einem Übersichtsartikel aus dem Jahr 2007 richtigerweise darauf hin, dass jedoch vor therapeutischen Entscheidungen wegen einer Clopidogrel-Resistenz (wie zum Beispiel Intensivierung der Therapie mit Dosissteigerung etc.) erst ein Konsens über einen besten Test und entsprechende Normwerte geschaffen werden müssen und anschließend nachgewiesen werden müsste, dass die so nachgewiesene Resistenz und die daraus abgeleitete Änderung der Therapie auch eine klinische Bedeutung hat (Christiaens L. et al. 2007). Dies wird auch im Kommentar von Freedmann et al. zu den aktuell veröffentlichten Studien zur Bedeutung von genetischen

Einflüssen auf den Clopidogrelstoffwechsel bestätigt (Freedmann JE. et al. 2009). Im Rahmen einer solchen Studie sollte auch der Forderung von Serebruany Rechnung getragen werden und neben einem etablierten Testverfahren zur Bestimmung der Clopidogreleffekte auf die Thrombozyten auch die Einflüsse der Plasmaspiegel von Clopidogrel-Metaboliten auf diesen Test und den klinischen Verlauf untersucht werden (Serebruany VL. et al. 2007).

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der vorliegenden Studie ist der PADA-Test als ein weiteres potentiell es Verfahren zum drug monitoring%anzusehen. Auf Grund seiner guten Verfügbarkeit im Routinelabor und dem fehlenden Einsatz von Agonisten eignet sich der PADA-Test gut zur Durchführung von Studien zur Untersuchung der klinischen Bedeutung von Thrombozyten-funktionsparametern nach akuter zerebraler Ischämie oder anderen atherothrombotischen Erkrankungen (wie z. B. KHK und Stent-Thrombose).

6.8. Einschränkungen der Studie

Die klinische Bedeutung eines erhöhten PADA-AI bei gesunden Probanden wurde bislang nicht untersucht. Sowohl in der Kontrollgruppe der vorliegenden Untersuchung als auch in der Gruppe der Probanden zur Bestimmung des Normbereiches für den PADA-AI durch den Hersteller finden sich Individuen mit deutlich erhöhten PADA-AI [Nowak G. et.al.2005, Figure 4 influence of age on the adhesion index (n = 220) healthy volunteers%].

Bei der Beurteilung der Änderung des PADA-AI nach neu begonnener Sekundärprophylaxe erhielten Patienten mit einem initial erhöhten PADA-AI signifikant häufiger Clopidogrel und unfraktioniertes Heparin i.v. als sAggrenox% so dass es ausgeschlossen ist, dass Patienten mit einem initial pathologisch erhöhten PADA-AI auch unter einer Therapie mit sAggrenox% eine signifikante Abnahme des PADA-AI im Verlauf zeigen könnten. Eher dagegen spricht jedoch, dass auch in der Patientengruppe mit einem initialen PADA-AI < 55 Clopidogrel zu einer signifikanten Abnahme des PADA-AI führte (im Ergebnisteil nicht dargestellt: n = 9, PADA-AI Mittelwert vor Prophylaxe 46,0, nach Beginn 39,3, Unterschied p = 0,032), während dies bei sAggrenox% nicht der Fall war.

Einschränkungen auf die Beurteilung der Zusammenhänge zwischen Infarktmorphologie und PADA-AI ergeben sich in der vorliegenden Untersuchung daraus, dass in dieser Studie die Infarktgröße nicht quantitativ vermessen wurde und bei der Einteilung in die Gruppen nach zerebralem Korrelat sowohl cCT als cMRT Befunde berücksichtigt wurden, so dass ein dadurch verursachter Fehler nicht auszuschließen ist.

Da zum Zeitpunkt der Studienplanung und des Studienbeginns Abweichungen des PADA-AI bei Doppelbestimmungen nicht bekannt waren, wurden wir von der Variabilität der PADA-AI in der Doppelbestimmung überrascht. Da anzunehmen ist, dass diese Variabilität über die Gruppen der Untersuchung in etwa gleich verteilt sein dürfte, ist mit einem wesentlichen Einfluss auf Studienergebnisse nicht zu rechnen. Letztendlich kann jedoch ein Einfluss auf

die Ergebnisse in Folge von Schwankungen des PADA-AI nicht ausgeschlossen werden. Eher dürfte sich der Effekt jedoch als Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses niedergeschlagen haben. Bei zukünftigen Studien mit dem PADA-Test sollten die Einflüsse von Schwankungen bei einer Doppelbestimmung in Form einer Konstanzprüfung mit berücksichtigt werden.

7. Schlussfolgerungen

1. In dieser Studie wird erstmal nachgewiesen, dass es bei Patienten mit einer akuten zerebralen Ischämie, insbesondere bei Vorliegen einer Stenose der hirnversorgenden Gefäße und bei ausgedehnten Hirninfarkten, zu einer signifikanten Erhöhung des PADA-AI im Vergleich zur Kontrollgruppe und Patienten mit einer TIA kommt. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die Änderung des PADA-AI Ursache oder Folge der akuten zerebralen Ischämie ist. Der PADA-Test bietet sich somit für zukünftige Studien an, um die diagnostischen und therapeutischen Konsequenzen einer Änderung der Thrombozytenaktivierung nach akuter zerebraler Ischämie und TIA näher zu untersuchen.

2. Die nachgewiesenen Unterschiede der Änderung des PADA-AI bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie in den Untergruppen nach TOAST Kriterien und Bildmorphologie der zerebralen Ischämie sprechen für eine unterschiedliche Thrombozytenaktivierung in Subgruppen der akuten zerebralen Ischämie. Diese Ergebnisse sollten bei der Planung zukünftiger Untersuchungen Berücksichtigung finden. Es wird zu untersuchen sein, inwieweit sich aus diesen Erkenntnissen unterschiedliche therapeutische Strategien bei der Wahl der Sekundärprophylaxe ableiten lassen. Da sich mit dem PADA-Test signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen nachweisen lassen, erscheint es weiterhin sinnvoll und wünschenswert, diesen Test zu benutzen, um die Frage zu klären, ob eine erhöhte Thrombozytenadhäsivität ein unabhängiger Risikofaktor ist, der eine Selektion in Bezug auf die Wahl des verwendeten Thrombozytenaggregationshemmers erlaubt, da sowohl ASS als auch die Kombination von ASS und retardiertem Dipyridamol (sAggrenox®) zu keiner signifikanten Beeinflussung der mit dem PADA-Test messbaren Thrombozytenadhäsivität führen.

3. Der PADA-Test eignet sich zur Verlaufsbeobachtung (drug monitoring) nach neu begonnener Sekundärprophylaxe mit Clopidogrel und sollte in größeren prospektiven Studien, die die klinischen Effekte einer neu begonnenen Sekundärprophylaxe untersuchen, Anwendung finden. Aufgrund seiner einfachen Durchführbarkeit und Implementierbarkeit im Routinelabor ist er zudem praktikabel und ständig verfügbar.

4. Die geringe Zahl von Komplikationen (Rezidivischämie und Blutungen) im Beobachtungszeitraum der vorliegenden Studie ermöglicht noch keine Aussagen zur möglichen prognostischen Wertigkeit des PADA-AI nach neu begonnener Sekundärprophylaxe. Die Ergebnisse des PADA-Tests können somit, nach der aktuellen Datenlage, nicht zur Auswahl oder Dosierung eines bestimmten Thrombozytenaggregationshemmers zur Sekundärprophylaxe nach akuter zerebraler Ischämie herangezogen werden. Hierzu bedarf es weiterer Untersuchungen.

5. Auf Grund der in der vorliegenden Studie erstmals nachgewiesenen erkrankungsunabhängigen Einflüsse der Thrombozytenzahl und des Patientenalters auf die Höhe des PADA-AI müssen in zukünftigen Studien mit dem PADA-Test diese Faktoren als Kofaktoren in den statistischen Analysen berücksichtigt werden.

6. Wichtig bei der Interpretation der Ergebnisse zukünftiger Studien mit dem PADA-Test ist die Berücksichtigung möglicher Abweichungen des PADA-AI im Rahmen einer Doppelbestimmung, wie sie in der vorliegenden Studie erstmalig nachgewiesen wurde. Es bedarf der weiteren Untersuchung, inwieweit diese Schwankungen des PADA-AI seine Aussagekraft und die Möglichkeit des drug monitoring beeinträchtigen.

7. Um zu analysieren, ob ein erhöhter PADA-AI ein unabhängiger Risikofaktor für thromboembolische oder arteriosklerotische Erkrankungen ist und sich aus dem PADA-AI therapeutische Konsequenzen in Bezug auf die Wahl des Thrombozytenaggregationshemmers ableiten lassen, ist eine langfristige prospektive Studie an einer großen Population sinnvoll und wünschenswert.

8. Literatur und Quellenverzeichnis

- Alan D. et al. 2000. Platelet GPIIIa PI Polymorphisms Display Different Sensitivities to Agonists. *Circulation*, 101: 1013- 18
- Angiolillo DJ. et al. 2005. Identification of low responders to a 300-mg clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stenting. *Thromb Res*, 115(1-2):101-8
- Angiolillo DJ. et al. 2004. High clopidogrel loading dose during coronary stenting: effects on drug response and interindividual variability. *Eur Heart*, 25(21):1903-10
- Angiolillo DJ. et al. 2004. PIA polymorphism and platelet reactivity following clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stent implantation. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 15(1):89-93
- Antithrombotic trialists collaboration. 2002. Collaborative metaanalysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction and stroke in high risk patients. *Brit Med J*, 324:71-84
- Arya M. et al. 2003. Glycoprotein Ib-IX mediated activation of integrin α (Ib) β (3): effects on receptor clustering and von Willebrand factor. *Thromb Haemost*, 1(6): 1150-7
- Ayala YM. et al. 2001. Molecular mapping of thrombin-receptor interactions. *Proteins Struct Funct Genet*, 45: 107-116
- Benetti J. et al. 1999. The platelet Cytoskeleton regulates the Affinity of the Integrin α IIb/ β 3 for Fibrinogen. *J of Biological Chemistry*, 274(3): 25301-7
- Bombeli Th. et al. 1998. Adhesion of activated platelets to endothelial cells. *J Exp Med*, Vol. 187 (3): 329-339
- Bonita R. 1992. Epidemiologie of stroke. *Lancet*, 339: 342-4
- Burkhardt T. et al. 2004. Platelet Adhesion Assay : Bestimmung der Thrombozytenfunktion und Monitoring einer Clopidogreltherapie bei Patienten mit KHK. *Clin Res Cardiol*, 96, Suppl.1, P871
- Cassar K et al. 2006. Variability in responsiveness to clopidogrel in patients with intermittent claudication. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 32(1):71-5
- Cattaneo M et al. 2003. Molecular bases of defective signaltransduction in the platelet P2Y₁₂ receptor of a patient with congenital bleeding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100:1978 -83
- Cherian P. et al. 2003. Endothelial and Platelet Activation in Acute Ischemic Stroke and its Etiological Subtypes. *Stroke*, 34: 2132-37

- Covic L et al. 2000. Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry*, 39: 5458-67
- Dangelmaier C. et al. 2001. Potentiation of thromboxane A2 induced platelet secretion by Gi signaling through the phosphoinositide-3 kinase pathway. *Thromb Haemost*, 85: 341-8
- Daniel JL et al. 1998. Molecular basis for ADP induced platelet activation. I: evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J Biol Chem*, 273: 2024-2029
- De Bruyn et al. 2003. The small GTPase RAP1 is activated by turbulence and is involved in integrin α IIb/ β 3 mediated cell adhesion in human megakaryocytes. *J Biol Chem*, 278: 22412-7
- Diener HC. et al. 2007. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie-Aktualisierung 2006. *Akt. Neurol*, 34:8-12
- Diener HC. et al. 2005. Essener Risk Score. *Expert Opin. Pharmacother.*, 6: 755-64
- Diener HC., Weber R. 2007. Akuttherapie und Prävention des Schlaganfalls. Sonderdruck Fortbildungskalender 7/07
- Dole VS. et al. 2005. Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of p-selectin. *Blood*, 106(7): 2334-9.
- Dwayne SG. et al. 2002. Plasma von Willebrand Factor and soluble P-Selektin as Indices of Endothelial Damage and Platelet Activation in 1321 Patients with Nonvalvular Atrial Fibrillation. *Circulation*, 106: 1962-1967
- Fateh-Moghadam S. et al. 2007. Hyperresponsiveness of platelets in ischemic stroke. *Thromb Haemost.*, 97(6): 974-8.
- Fitzgerald DJ. et al. 2007. Aspirin and Clopidogrel resistance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Progr.*, 114-20
- Freedman JE. et al. 2009. Clopidogrel, Genetics, and Drug Responsiveness. *N Engl J Med.*, 360: 411-13
- Fusegawa Y. et al. 2006. Hypertensive Patients with carotid plaque exhibit increased platelet aggregability. *Thromb Res.*, 117(6): 615-22
- Gawaz M. et al. 1996. Platelet activation and coronary stent implantation. Effect of antithrombotic therapy. *Circulation*, 94(3):279-85
- Goldmann B. et al. 2007. Evaluation des Platelet Adhesion Assay (PADA) als Bedside Kontrolle plättchenhemmender Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Abstractband Jahrestagung DGIM, Poster 146.

- Geiger J. et al. 2005. Monitoring of clopidogrel action: comparison of methods. Clin Chem., 51(6):957-65
- Gilstad JR. et al. 2008. Relationship between age and platelet activation in patients with stable and unstable angina. Arch Gerontol. Geriatr. (Abstract) Feb 16 (ahead to print)
- Goldmann B. et al. 2007. Evaluation des Platelet Adhesion Assay (PADA) als Bedside-Kontrolle plättchenhemmender Therapie bei koronarer Herzkrankheit. Abstractband Jahrestagung DGIM 2007.
- Goto S. 2004. Understanding the mechanism of platelet thrombus formation under blood flow conditions and the effect of new antiplatelet agents. Current Vascular Pharmacology, 2:23-32
- Goto S. 2002. Involvement of GPVI in platelet thrombus formation on both collagen and VWF surfaces under flow conditions. Circulation; 106:266-72
- Goto S. et al. 2002. Effects of ADP receptor blockade on platelet aggregation under flow. Blood; 99: 4644-5
- Graff J. et al. 2005. Investigation of the PADA as a Method for Monitoring GPIIb/IIIa Inhibitors and other Antiplatelet Agents. Seminars in thrombosis and hemostasis, 1(4): 482-5
- Grau A. et al. 1998. Increased Fraction of Circulating Activated Platelets in Acute and Previous Cerebrovascular Ischemia. Thromb Haemost 80: 298-301
- Grau A. et al. 2001. Risk factors, outcome and treatment in subtypes of ischemic stroke, the German stroke data bank. Stroke 32 (11) : 2559-66
- Graeme JH. et al. 2006. Aspirin resistance . Review. Lancet, 367: 606-17
- Grubel PA. et al. 2000, Oral platelet IIb/IIIa inhibitors : from attractive theories to clinical failures. J Thromb Thrombolysis; 10:217-20
- Harding SA. et al. 2006. Promotion of proinflammatory interactions between platelets and monocytes by unfractionated heparin. Heart, 92(11):1635-8
- Harold P. et al. 1993. Classification of Subtype of Acute Ischemic Stroke. Stroke, 24:35-41
- Harrison P. et al. 2005. Screening for aspirin responsiveness after transient ischemic attack and stroke: comparison of 2 point-of-care platelet function tests with optical aggregometry. Stroke, 36(5):1001-5
- Hezard N. et al. 2005. Platelet VASP phosphorylation assessment in clopidogrel-treated patients: lack of agreement between Western blot and flow cytometry. Platelets, 16(8):474-81

- Hollopeter G. et al. 2001. Identification of the platelet ADP Receptor target by antithrombotic drugs. *Nature*, 409:202-7
- Hon-Kan Y. et al. 2006. Platelet Activation in Patients with chronic Nonvalvular Atrial Fibrillation. *Int Heart J*, 47(3): 371-79
- Htun P. et al. 2006. Course of Platelet Activation and Platelet-Leukocyte Interaction in Cerebrovascular Ischemia. *Stroke*, 37: 2283-87
- Jagroop JA. et al. 2003. Both the ADP receptors P2Y1 and P2Y12 play a role in controlling shape change in human platelets. *Platelets*, 14: 15-20
- Kauffstein G. et al. 2001. The P2Y12 receptor induces platelet activation through weak activation of the α (IIb) β (3) integrin-a phosphoinositide 3-kinase mechanism. *FFBS Lett.*, 505: 281-90
- Kaul S. et al., 1994. Interaction of human platelets and leukocytes in modulation of vascular tone. *Am J Physiol.* 266: 1706-14.
- Klein B. et al. 2002. A whole blood flow cytometric determination of platelet activation by unfractionated and low molecular weight heparin in vitro. *Thromb. Res.*, 108(5-6):291-6
- Kleinschnitz C. et al. 2007. Targeting platelets in Acute Experimental Stroke: Impact of GPIIb, GPIV and GPIIb/ IIIa Blockade on Infarct Size, functional Outcome and Intracranial Bleeding. *Circulation*, 115: 2323-30
- Kolomski-Rabas P. et al. 1998. ESPro. *Stroke*, 29 : 2501-2506
- Kozuka K. et al. 2002. Endothelial markers and adhesion molecules in acute ischemic stroke . sequential change and differences in stroke subtype. *Atherosclerosis*, 161(1): 161-8
- Krischek B. et al. 2005. Adhesion, Spreading and Aggregation of Platelets in flowing Blood and the Reliability of the Retention Test Homburg. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 31: 449-57
- Krischek B. et al. 2005. Role of the Retention Test Homburg in Evaluating Platelet Hyperactivity and in Monitoring Therapy with Antiplatelet drug. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 31: 458-63
- Lev El. et al. 2007. Genetic polymorphisms of the platelet receptors P2Y(12), P2Y(1) and GP IIIa and response to aspirin and clopidogrel. *Thromb Res.*, 119(3):355-60
- Leys D. et al. 2006. Detection and management of associated atherothrombotic locations in patients with a recent atherothrombotic ischemic stroke: results of the DETECT survey. *Cerebrovasc Dis.*, 21(1-2): 60-6
- Mani H. et al. 2008. Determination of clopidogrel main metabolite in plasma: a useful tool for monitoring therapy? *Ther drug Monit.*, 30(1):84-9

Marcus E. et al. 2003. Aspirin inhibits surface glycoprotein IIb/IIIa, p-selektin, CD63 and CD 107a receptor expression on human platelets. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 14 : 249-253

Matetzky S. et al. 2004. Clopidogrel Resistance in association with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 109(25): 3064-7.

May AE. et al. 1997. Reduction of monocyte-platelet interaction and monocyte activation in patients receiving antiplatelet therapy after coronary stent implantation. *Eur Heart J.*, 18(12):1913-20

McBane RD. et al. 2003. Platelet Characteristics associated with coronary artery disease. *J Thromb Haemost.*, 1(6): 1296-303

McCabe DJ et al. 2005. Increased platelet count and leukocyte-platelet complex formation in acute symptomatic compared with asymptomatic severe carotid stenosis. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76(9): 1249-54

Mega JL et al. 2009. Cytochrome P-450 Polymorphisms and Response to Clopidogrel. *N Engl J Med.*, 360: 354-62

Merten M. et al. 2004. P-Selektin in arterial thrombosis. *Z Kardiol.*, 93(11): 855-63

Michelson AD. et al. 2007. Evidence that pre-existent variability in platelet response to ADP accounts for 'clopidogrel resistance'. *J Thromb Haemost.*, 5(1):75-81

Milovanovic M. et al. 2003. Identification of low density platelet populations with increased reactivity and elevated alpha-granula content. *Thromb Resarch.*, 111:75-80

Moser M. et al. 2003. Abciximab, eptifibatide, and tirofiban exhibit dose-dependent potencies to dissolve platelet aggregates. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 41(4) 586-92

Müller I. et al. 2003. Prevalence of Clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost.*, 2003. 89(5): 783-7

Müller-Schunk et al. 2008. Monitoring of Clopidogrel-related Platelet Inhibition: Correlation of Nonresponse with clinical Outcome in Supra-aortic Stenting. *AJNR*, 29: 786-91

Nicole YL. et al. 2002. Effect of stress hormone on the expression of fibrinogen-binding receptors in platelets. *Resuscitation*, 55: 277-283

Nowak G. et al. 2005. Platelet Adhesion Assay . A New Quantitative Whole Blood test to Measure Platelet Function. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 31 (4):470-75

Nylander S. et al. 2004. The relative importance of the ADP receptors, P2Y₁₂ and P2Y₁ in thrombin-induced platelet activation. *Br J Pharmacol* 142(8): 1325-31

Ostato A. 2004. Über den Einfluss einer GPIIb/IIIa Rezeptorblockade auf die flussabhängige Dilatation der Arteria brachialis bei perkutaner Koronarintervention. Dissertation an der Universität Hamburg

PADA . Platelet Adhesion Assay, 20.8.2003. Produktinformation Firma HAEMOSYS gmbH, Winzerlaer Str. 2, D 07745 Jena

Pannicia R. et al. 2007. Comparison of different methods to evaluate the effect of aspirin on platelet function in high-risk patients with ischemic heart disease receiving dual antiplatelet treatment. *Am J Clin Pathol.*, 128(1):143-9

Payne DA. et al. 2007. Therapeutic Benefit of Low-Dose Clopidogrel in Patients Undergoing Carotid Surgery Is Linked to Variability in the Platelet Adenosine Diphosphate Response and Patients' Weight. *Stroke* 26

Pernestorfer T. et al. 2001. Effects of heparin and aspirin on circulating P-selectin, E-selectin and von Willebrand Factor levels in healthy men. *Atherosclerosis*, 155(2):389-93

Pizzuli L. et al. 1998. Changes in Platelet size and count in unstable angina compared to stable angina or non cardiac chest pain. *Eur.Heart.J.*, 19(1):80-4

Polanowska-Grabowska R. et al. 1999. Platelet Adhesion to collagen Type I, Collagen Typ IV, vWF, Fibronectin, Laminin and Fibrinogen: rapid kinetics under shear. *Thromb Haemost.*, 81: 118-23

Prabhakaran S. et al. 2008. Prevalence and risk factors for aspirin and Clopidogrel resistance in cerebrovascular stenting. *AJNR*, 29(2): 281-5

Reinhardt WH. et al. 2002. Blood viscosity and platelet function in patients with obstructive sleep apnea syndrome treated with nasal continuous positive airway pressure. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 27: 201-207

Ringelstein EB. und Weiller C. 1990. Hirninfarktmuster im Computertomogramm. *Nervenarzt*, 61: 462 - 471

Ringleb P. et al. 2004. Benefit of Clopidogrel Over Aspirin Is Amplified in Patients with a History of Ischemic Events. *Stroke*, 35: 528-532

Ruggeri ZM., Mendolicchio GL. 2007. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ. Res.*, 100(12): 1673-85.

Sacco RL. et al. 2008. Aspirin and extended-release Dipyridamole versus Clopidogrel for recurrent stroke. *N Engl J Med*, 359

Santos MT. et al. 2000. Participation of tyrosine phosphorylation in cytoskeletal reorganisation, α IIb/ β IIIa Integrin Receptor activation, and Aspirin insensitive mechanism of thrombin stimulated human platelets. *Circulation*; 102: 1924-1930)

Savage B. et al. 1992. Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin α IIb β 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J Biol.Chem.*, 267(16) 11300-6

Savage B. et al. 1998. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*, 94(5): 657-66

Savage B. et al. 1996. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*. 84(2): 289-97

Savcic M. et al. 1999. Clopidogrel loading dose regimes: kinetic profile of pharmacodynamic response in healthy subjects. *Semin Thromb Hemost* 25(2): 15-9

Savi P. et al. 1994. The anti-aggregating activity of clopidogrel is due to a metabolic activation in the hepatic cytochrom P450-1A. *Thromb Haemost*, 72:313-7

Schumann A. et al. 2005. Is Platelet Adhesion Assay Able to quantify Drug-induced Platelet Dysfunction? *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 31(4): 476-81

Schumann A. et al. 2004. *Hämostasiologie*, 24: 212-6

Serebruany VL. et al. 2007. Clopidogrel resistance: myth or reality? *Kardiologia*, 47(10):69-72

Serebruany VL. et al. 2004. Magnitude and time course of platelet inhibition with Aggrenox and Aspirin in patients after ischemic stroke: the AGgrenox versus Aspirin Therapy Evaluation (AGATE) trial. *Eur J Pharmacol.*, 499(3): 315-24

Serebruany V. et al. 2007. Consistent platelet inhibition during long-term maintenance-dose clopidogrel therapy among 359 compliant outpatients with documented vascular disease. *Am Heart J.*, 153(3):371-7

Serebruany V. et al. 2008. Baseline platelet activity and response after clopidogrel in 257 diabetics among 822 patients with coronary artery disease. *Throm Haemost.*, 2008 Jul;100(1):76-82

Shattil SJ. et al. 1998, Integrin signaling : the platelet paradigm. *Blood*, 91: 2645-2657

Sick P. et al. 2004. Kontrolle der Thrombozyteninhibitor-Therapie mit einem neuen Plättchenadhäsionstest (PADA). *Z Kardiol.*, 93: Suppl.3 : P1337

- Simon T. et al. 2009. Genetic Determinations of Response to Clopidogrel and Cardiovascular Events. *N Engl J Med.*, 360 : 363-75
- Sinauridze E.I. et al. 2007. Platelet microparticle membranes have 50- to 100 fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost.*, 97: 425-34
- Sunil K. et al. 2004. Platelet morphology, soluble P selectin and platelet P-selectin in acute ischaemic stroke. *Thromb Haemost.*, 92: 1342-8
- Tatli M. et al. 2006. Could platelet aggregation ratio be an indicator for differential diagnosis of TIA and cerebral ischemic stroke? *Cerebrovasc Dis.* 22(5-6): 372-7
- Ullrich P. et al. 2003. Association of CIB with GPIIb/IIIa during outside-in signaling is required for platelet spreading on fibrinogen. *Blood*, Vol. 102 (4): 1355-62
- Valkila E.H. et al. 1994. Platelet indices in patients with occlusive carotid artery disease. *Neurology*, 45(5): 361-5.
- Victor L. et al. 2002. Risiko von Blutungskomplikationen bei Thrombozytenfunktionshemmern . Meta-Analyse. *ANA Abstract*
- Vu TK et al, 1991, Molecular cloning of a functional Trombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 64: 1057-68
- Warnholtz A. et al. 2004. Akute Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptorblockade verbessert die Endothelfunktion in arteriellen Leitungsgefäßen bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. *Z Kardiologie*, 93, Suppl.2: V850
- Weber AA. et al. 2008. Methods to evaluate aspirin and Clopidogrel resistance. *Haemostaseologie*, 28(1): 66-71.
- Weimar C. und Diener HC. 2003. Diagnose und Therapie der Schlaganfallbehandlung. Ergebnisse der deutschen Schlaganfallbank. *Deutsches Ärzteblatt*, 100(4):2576-82
- Weiss H.J. et al., 1975, Platelet physiology and abnormalities of platelet function. *N Engl J Med.*, 293:531-41 & 580-8
- Whiss P., Andersson RGG. 2002. Divalent cations and the protein surface coordinate the intensity of human platelet adhesion and p-selectin surface expression. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 13(5): 407-416
- Xu W.F. et al. 1998. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 6642-6
- Yamazaki M. et al. 2001. Measurement of Platelet Fibrinogen Binding and P-Selectin Expression by Flow Cytometry in Patients with Cerebral Infarction. *Thrombosis Research*, 104: 197-205.

Xiao Z. et al. 1998. Platelet activation with unfractionated heparin at therapeutic concentrations and comparisons with a low-molecular-weight heparin and with a direct thrombin inhibitor. *Circulation*. 97(3):251-6

Zeller JA. et al. 1999. Circulating platelets show increased activation in patients with acute cerebral ischemia. *Thromb Haemost.*, 81(3): 373-7

Zeller JA et al. 2000. Clinical application of detecting platelet activation markers in cerebrovascular disease. *Infus Ther Transfus Med.*, 27:250-5

9. Anhang

9.1. Verzeichnis der erwähnten Rezeptoren und Antigenbezeichnungen sowie deren Funktion

Rezeptor	Bezeichnung	Funktion
GPIIb/IIIa	CD 41 PAC-1 AK	Bindung an Fibrinogen im aktiven Zustand
GPIb	CD 42	Vorkommen in Alpha- und densed Granula, bildet den GPIb-IX-V Komplex Verantwortlich für die Bindung an Endothel über den vWF, kann auch durch Thrombin aktiviert werden und führt zur Freisetzung von p-Selektin
GP VI		Kollagenrezeptor der Thrombozyten
p-Selektin	CD 62p	Aktivierungsmarker nach Freisetzung von p-Selektin aus den Thrombozyten
Vitronectin	CD 51/61	Vermittelt die Anheftung der Thrombozyten an Osteopontin (GP) an Plaques
PECAM-1	CD 31	Adhäsionsmolekül an Thrombozyten und Leukozyten, vermittelt die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten sowie Endothel und ist möglicher Ko-Stimulator
h-LAMP-1	CD 107a	Lysosomen assoziiertes Membranprotein. 1 Aktivierungsmarker von Thrombozyten und Vorkommen in Lysosomen, trägt zur Anheftung an Thrombozyten, Leukozyten und Endothel bei
LAMP-2	CD 107b	Lysosomaler Aktivierungsmarker, der nicht in der Alpha-Granula und Dens-Granula vorkommt
LAMP-3	CD 63	Aktivierungsmarker der in der Alpha-Granula vorkommt
PETA-3	CD 151	Teil des Fc-gamma-RII Signal-Übertragungs-Komplex der Thrombozyten . trägt zur Aggregation bei
PAR-1		protease-activated receptor 1

9.2. Essener Stroke Rezidiv Score (ESRS)

Risikofaktor	Punkte
< 65 Jahre	0
65-75 Jahre	1
>75 Jahre	2
arterielle Hypertonie	1
Diabetes mellitus	1
Anamnestisch Herzinfarkt	1
Andere kardiovaskuläre Risikofaktoren (außer Myokardinfarkt und Vorhofflimmern)	1
pAVK	1
Rauchen	1
TIA oder ischämischer Schlaganfall zusätzlich zum qualifizierenden Ereignis	1
Summe	

9.3. Lebenslauf

- geboren am 28.02.1966 in Erfurt
- Schulabschluss mit Abitur 1984 in Erfurt
- 1984 . 1987 Wehrdienst
- 1987 . 1993 Studium Humanmedizin an der Medizinischen Akademie Erfurt
- 1.9.1993 . 31.8.1994 AiP in der Klinik für Neurologie der Hufeland Kliniken Weimar GmbH
- 1.9.1994 . 28.2.1995 AiP in der Klinik für Psychiatrie der Hufeland Kliniken Weimar GmbH
- 01.03.1995 ärztliche Approbation
- 01.03. 1995 . 31.12.1996 AiW in der Klinik für Neurologie der Hufeland Kliniken Weimar GmbH
- 1.1.1997 . 30.4.1999 AiW in der Klinik für Neurochirurgie des Klinikum Erfurt GmbH
- 1.5. 1999 . 31.10. 2001 AiW neurologische Frührehabilitation in der ~~der~~ Klinik Schloß Pulsnitz%der Wittgensteiner AG
- 1.11. 2001 . 31.8.2002 AiW in der Klinik für Psychiatrie des Städtischen Krankenhaus Dresden Neustadt
- 1.9.2002 . 28.10.2004 AiW Klinik für Neurologie und Klinische Neurophysiologie am Sophien . und Hufeland Klinikum Weimar gGmbH
- 28.10.2004 Facharzt für Neurologie
- 29.10.2004 . 31.12.2005 Facharzt an der Klinik für Neurologie und Klinische Neurophysiologie des Sophien . und Hufeland Klinikum Weimar gGmbH
- seit 1.1.2007 Oberarzt an der Klinik für Neurologie und Klinische Neurophysiologie des Sophien . und Hufeland Klinikum Weimar gGmbH
- verheiratet, wohnhaft in Weimar

9.4. Danksagung

Ich danke allen Patienten / - innen, die sich zu der Studie bereit erklärt haben, und den Mitarbeitern / -innen vom Labor des Sophien . und Hufeland Klinikums Weimar gGmbH für die Durchführung des PADA - Tests.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. habil. R. Malessa für die geduldige und sachkundige Unterstützung bei der Planung der Studie und Erstellung des Manuskriptes und meiner Ehefrau, für die oft nötige Motivation und die Zeit die sie mir zur Verfügung gestellt hat.

9.5. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. habil. R. Malessa, Klinik für Neurologie und Klinische Neurophysiologie des Sophien- und Hufeland Klinikum Weimar gGmbH
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen und
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule zur Dissertation eingereicht habe.

Weimar, den

Peter Möller, Verfasser